

日本農芸化学会中四国支部第 16 回市民フォーラム
日本農芸化学会中四国支部第 32 回講演会
日本生物工学会西日本支部第 1 回講演会
合同講演会

講演要旨集

日時：2012 年 1 月 21 日（土）

場所：鳥取大学 農学部

日本農芸化学会中四国支部
日本生物工学会西日本支部

日本農芸化学会中四国支部 第32回講演会(例会)
日本生物工学会西日本支部 第1回講演会
日本農芸化学会中四国支部 第16回 市民フォーラム

【プログラム】

【会場】 鳥取大学 農学部(講演会)
生協第二食堂(懇親会)
(〒680-8550 鳥取市湖山町南 4-101)

2012年1月21日(土)

11:00～12:00 日本農芸化学会中四国支部役員会(農学部1号館2階大セミナー室)

12:10～13:00 日本農芸化学会中四国支部評議員会(農学部2号館2階大会議室)

13:10～14:20

● **第16回日本農芸化学会中四国支部市民フォーラム**

「農学分野で活躍する女性研究者」(農学部 大講義室)

座長 大城 隆

1「安全な農薬をつくるために」

(赤松 美紀・京都大)

座長 中島廣光

2「カビはどうやって発癌物質アフラトキシンを作るか」

(矢部 希見子・食品総合研究所)

14:30～15:00

● **2011年度日本農芸化学会技術賞受賞講演** (農学部 大講義室)

座長 大城 隆

「FAD グルコース脱水素酵素の発見とそれを応用した新規血糖値センサの開発」

(小村 啓悟・池田糖化工業(株))

15:15～17:30

● **一般講演** (農学部1号館 第3～第7講義室)

☆発表はPCプロジェクターを使用いたします。各自パソコンをご持参ください。

16:30～17:30 日本生物工学会西日本支部評議員会 (農学部2号館2階大会議室)

18:00～19:30

● **懇親会** (生協第二食堂)

一般講演プログラム（発表9分，質疑2分）

【A会場：農学部第3講義室】

座長：阿座上弘行（山口大農）

15：15

A - 1 酵母の発酵特性に対するサンショウの作用（2）加熱処理条件の影響

○小野みどり¹，藤原 誠²，松元信也^{1,2}

（¹高知工科大工・物質・環境，²高知工科大院・物質・環境）

15：26

A - 2 サンショウを利用した発酵促進剤の開発

○藤原 誠¹，小野みどり²，松元信也^{1,2}

（¹高知工科大院・物質・環境，²高知工科大工・物質・環境）

15：37

A - 3 微生物の発酵特性に対するアミグダリンの作用

○西澤和展，喜田和亨，松元信也

（高知工科大院・物質・環境）

15：48

A - 4 バイオエタノールの省エネルギー的高効率発酵システムの開発（8）

細菌による通気式アルコール発酵システムに関する検討

○梶原秀一¹，仲上将央²，西澤和展¹，松元信也^{1,2}

（¹高知工科大院・物質・環境，²高知工科大工・物質・環境）

座長：松元信也（高知工科大院）

15：59

A - 5 *Hydrogenophilus* 属細菌の高温環境での広域な分布を支える酸化的リン酸化

○若井 暁¹，西原宏史²，三本木至宏¹

（¹広大院・生物圏，²茨城大農）

16：10

A - 6 食品由来成分による歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィーム抑制

○高椋美紀¹，松永哲郎¹，池田知代¹，會見忠則²，加藤昭夫¹，阿座上弘行¹

（¹山口大農，²鳥取大農）

座長：梶間由幸（米子高専・物質工）

16：21

A - 7 ポリフェノール酸化物の新機能— α -グルコシダーゼ，キサントニンオキシダーゼ阻害能と活性物質—

新開愛美，○藤本 彩，中村光裕，増田俊哉

（徳島大院・総合）

16：32

A - 8 ピーマンにおけるフラボノイド生合成に対する光の影響

手林慎一¹，吉田勝平²，大西信太郎³

（¹高知大農，²高知大理，³愛媛連大・農）

座長：石原 亨（鳥取大農）

16：43

- A - 9 フェルラ酸配糖体の合成とラジカル捕捉能について
○澤田佳帆¹， 榎間由幸¹， 藤井雄三¹， 土江松美²
(米子高専・物質工¹， 阪市大院理²)

16：54

- A - 10 睡眠病治療薬ケロノプシンのフラグメント A, B の合成研究
○下寄康裕， 兵江駿一， 野口太郎， 榎間由幸
(米子高専・物質工)

17：05

- A - 11 イオン液体を用いた木質成分・リグニンの分解反応
○本田望実¹， 榎間由幸¹， 渡辺隆司²， 吉岡康一²
(¹米子高専・物質工， ²京大・生存圏研)

座長：榎間由幸（米子高専・物質工）

17：16

- A - 12 糸状菌 *Fusarium oxysporum* が生産するアフラトキシン生合成阻害物質
○川元彩香¹， 石原 亨²， 矢部希見子³， 中島廣光²
(¹鳥取大院・農， ²鳥取大農， ³食総研)

【B会場：農学部第4講義室】

座長：川向 誠（島根大生物資源）

15：15

- B - 1 芋や栗の加工処理後に得られる規格外品を用いた焼酎醸造法の検討
○村上 潤¹， 加藤麗奈²， 上東治彦²， 村松久司¹， 永田信治¹
(¹高知大農， ²高知県工技セ)

15：26

- B - 2 野生酵母と乳酸菌の培養に適したヤーコンやトマトを用いた低コスト製パン法
○藤本ゆかり¹， 茂野光正²， 坂本奈穂¹， 須藤千賀¹， 木村有希¹， 金子美幸¹，
柳 裕子¹， 村松久司¹， 永田信治¹
(¹高知大農， ²ベーカリー・ペロリ)

15：37

- B - 3 餌料への添加を目的とした乳酸菌の探索とペットへの摂取効果の検討
○木村有希¹， 穴井直博²， 井上寿子¹， 坂本奈穂¹， 柳 裕子¹， 松尾知佳¹，
村松久司¹， 永田信治¹
(¹高知大農， ²アミール動物病院)

15：48

- B - 4 β -1,3-グルカン， β -1,6-グルカンの定量に適した β -グルカナーゼの探索と評価
○松岡靖子¹， 高本裕果¹， 清野由佳¹， 宮脇香織^{1,2}， 中谷麻衣^{1,2}， 松尾知佳¹，
平尾智美¹， 村松久司¹， 永田信治¹
(¹高知大農， ²ソフィ)

座長：永田信治（高知大農）

15：59

- B - 5 分裂酵母の非性的凝集に関わる *czf1* 遺伝子の解析
○景山瑤子, 大石和義, 大渡康夫, 川向 誠
(鳥根大生物資)

16：10

- B - 6 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* における誘導的オートファジー
○弥生貴裕, 渡邊 彰, 麻田恭彦
(香川大農)

16：21

- B - 7 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はファージ感染により高病原化する
○山田和範, 加藤昭夫, 阿座上弘行
(山口大農)

座長：渡邊 彰（香川大農）

16：32

- B - 8 大腸菌を宿主とした放線菌由来 ϵ -リジンアシラーゼ発現条件の検討
○黒木健太郎¹, 田口友造², 内田達也², 今村維克², 今中洋行², 中西一弘³
(¹岡山大工・生物機能, ²岡山大院・自然, ³中部大応用生物)

16：43

- B - 9 分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 のテロメアにおける機能解析
升田賢太, 高橋克典, ○上野 勝
(広島大院・先端物質)

16：54

- B - 10 トリブチルスズ耐性に関与する分裂酵母 ABC トランスポーター遺伝子の同定
○秋山浩一¹, 櫻井康雄², 関藤孝之², 河田美幸¹, 柿沼喜己^{1,2}
(¹愛媛大総合科, ²愛媛大農)

17：05

- B - 11 Fungal metabolites for assessment of *Ganoderma boninense* pat. infection in oil palm
○ Roger Lieu Toh Choon, Sariah Meon, Siti Mariam
(University Putra Malaysia, Faculty of Agriculture)

【C会場：農学部第5講義室】

座長：田村純一（鳥取大地域）

15：15

- C - 1 母乳20検体中のビタミンB₆とピリドキシン-β-グルコシド含有量
○岩本沙耶¹, 古屋美知², Do Thi Viet Huong¹, 中山和子², 八木年晴¹
(¹高知大農, ²高知学園短期大)

15 : 26

- C - 2 筋萎縮抑制効果を示すプレニル化ケルセチンの生体利用性
○藤倉 温¹, 向井理恵¹, 河村知志², 室田佳恵子³, 根本尚夫², 寺尾純二¹
(¹徳島大栄養, ²徳島大薬, ³近畿大理工)

15 : 37

- C - 3 ケルセチン配糖体体内代謝物分子プローブの合成
○山口佑也, 斎木俊也, 村田芳行, 中村宜督
(岡山大院・自然科学)

15 : 48

- C - 4 筋細胞を用いた脂肪酸代謝促進成分スクリーニング手法の開発
○阿部大吾, 齋藤 武, 野方洋一
(農研機構・近中四農研)

座長 : 横田一成 (島根大生物資)

15 : 59

- C - 5 Immunoregulatory proprieties of *Echinacea purpurea* in murine splenocytes
○Elliot RAKOTOMANANA¹, Tasuku OGITA², Kiminori MATSUBARA¹,
Takuya SUZUKI², and Soichi TANABE²
(¹Graduate School of Education and ²Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

16 : 10

- C - 6 エチレン共重合体系ポリマーコートしたリモネン・β-シクロデキストリン包接体の噴霧乾燥粉末の作製
○山本智昭^{1, 2}, Tze Loon Neoh², 本坊洋一², 木村伸一¹, 吉井英文²
(¹鳥取産技セ, ²香川大農)

16 : 21

- C - 7 魚肉タンパク質の加熱ゲル化に及ぼすD-プシコースの影響
○井上雅貴, 小川雅廣, 早川 茂
(香川大院・農研科)

16 : 32

- C - 8 魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量調査と組成分析
○有馬和也¹, 藤田裕之¹, 今津綾夏¹, 堤下 - 中井奈緒¹, 武田尚子¹, 中尾康裕¹,
松下健也¹, 川野愛美¹, 田中晴奈¹, 中村 歩¹, 森本 慎¹, 王 恵¹, 八東龍也¹,
稗田優香¹, 北垣雅広¹, 林 宏樹¹, 奥原隆司¹, 湯村 健¹, 渡辺彩子¹, 中山 清²,
石原幸雄³, 増田紳哉³, 吉岡俊介⁴, 吉岡 忍⁴, 白出征三⁵, 田村純一¹
(¹鳥取大地域・地域環境, ²カンダ技工, ³鳥取水試, ⁴オーク, ⁵白謙蒲鋒)

座長：寺尾純二（徳島大栄養）

16：43

C - 9 キサンテン系食用色素と血清アルブミンの機能的相互作用

○進 裕子, 高野 大, Qi Hang, 村田芳行, 中村宜督
(岡山大院・自然科学)

16：54

C - 10 生もと酒母における苦味ペプチドの動向

○伊藤一成, 福崎智司, 産本弘之, 三宅剛史
(岡山県工技セ)

17：05

C - 11 トチノキ種皮, ブルーベリーおよびクランベリー由来のプロアントシアニジンのチオリシスによる構造分析

○小川智史¹, 木村英人¹, 秋廣高志², 横田一成^{2,3}
(¹寿製菓, ²島根大生物資, ³鳥取大院連農)

17：16

C - 12 鳥取県大山産ブルーベリーリーフ熱水抽出物の血糖値上昇抑制効果

○山田卓弘¹, 橋本恵利¹, 藪田行哲¹, 川端雄勇², 渡辺文雄¹
(¹鳥取大農, ²(株)かわばた)

【D会場：農学部第6講義室】

座長：村田芳行（岡山大院・自然）

15：15

D - 1 宇宙環境で生育するミズナの遺伝子発現解析

○金森太治郎¹, Gusev, O.², Bingham, G.³, Levinskikh, M.⁴, Sychev, V.⁴, Hummerick, M.⁵,
Wheeler, R.⁵, 今野晴義¹, 杉本 学¹
(¹岡山大・植物研, ²NIAS, ³ユタ州立大・SDL, ⁴IBMP・RAS, ⁵NASA・KSC)

15：26

D - 2 ストレス応答における葉緑体由来の H₂O₂ シグナリングの生理機能

○丸田隆典¹, 芦田奈々¹, 野志昌広², 藪田行哲³, 吉村和也⁴, 澤 嘉弘¹, 石川孝博¹, 重岡 成²
(¹島根大生物資・生命工, ²近畿大農・バイオ, ³鳥取大農・生資環, ⁴中部大応生・食栄)

15：37

D - 3 植物ホルモン・オーキシンの光による投与制御

○林 謙一郎, 山崎壮真, 野崎 浩
(岡山理大院・生物化学)

座長：林 謙一郎（岡山理大院・生物化学）

15：48

D - 4 フコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 株由来フコイダン低分子化酵素の特性

大城 隆¹, ○小林泰明¹, 原田尚美¹, 三木康成², 川本仁志²
(¹鳥取大工, ²海産物のきむらや)

15 : 59

D - 5 スーパーフォルダー GFP 発現系の構築と機能解析

○森 祐磨, 田村 隆, 稲垣賢二

(岡山大院・自然科学)

16 : 10

D - 6 放線菌 *Rhodococcus opacus* NBRC 100624 株由来低基質特異性 L-アミノ酸オキシダーゼの性質検討

○新屋敷健悟¹, 日下部 均², 田村 隆¹, 稲垣賢二¹

(¹岡山大院・自然科学, ²(株)エンザイムセンサ)

座長 : 藪田行哲 (鳥取大農)

16 : 21

D - 7 *Pseudomonas* 由来ファミリー S58 アミノペプチダーゼの酵素化学的性質

○田中あゆみ, 森本正純, 森 信寛, 有馬二郎

(鳥取大農)

16 : 32

D - 8 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口へのアブシジン酸の役割

○叶 文秀¹, Mohammad Anowar Hossain¹, 中村宜督¹, 森 泉², 村田芳行¹

(¹岡山大院自然, ²岡山大植物研)

16 : 43

D - 9 Methylglyoxal induces stomatal closure accompanied by peroxidase - mediated ROS production in *Arabidopsis*

○Tahsina Sharmin Hoque, Misugi Uraji, Wenxiu Ye, Yoshimasa Nakamura,
Yoshiyuki Murata

(Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

座長 : 有馬二郎 (鳥取大農)

16 : 54

D - 10 Positive regulation of SA signaling by MAP kinases, MPK9 and MPK12, in *Arabidopsis* guard cells

○Mohammad Abdus Salam¹, Fabien Jammes², Mohammad Anowar Hossain¹,
Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori³, June M. Kwak², Yoshiyuki Murata¹

(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²Dept. Cell Biol. & Mol. Genet., Univ. Maryland,
³IPSR, Okayama Univ.)

17 : 05

D - 11 Roles of myrosinases in stomatal movement in *Arabidopsis*

○Mohammad Shakhawat Hossain¹, Mohammad Mahbub Islam¹, Misugi Uraji¹,
Eiji Okuma¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹

(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

17 : 16

D - 12 シロイヌナズナ *vtc2* 変異体におけるアスコルビン酸取込み能の評価

○山本 遥, 孝田 翔, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博

(鳥根大生物資・生命工)

【E会場：農学部第7講義室】

座長：木村吉伸（岡山大院・自然）

15：15

E - 1 酢酸菌膜結合型ヘテロ3量体フラボプロテイン・ソルビトール脱水素酵素における小サブユニット SldS の役割

○薬師寿治¹, 有常真由美¹, Wichai Soemphol², 外山博英³, 松下一信¹
(¹山口大農, ²コンケン大学, ³琉球大農)

15：26

E - 2 牛乳ラクトパーオキシダーゼの細菌リポポリサッカライドとの結合性について

○西本尚史, 早川 茂, 小川雅廣
(香川大農)

15：37

E - 3 細胞内導入型転写因子と両親媒性ペプチドの併用による機能発現の向上

○榎原将紘, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳, 二見淳一郎
(岡山大工)

座長：二見淳一郎（岡山大工）

15：48

E - 4 Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase, the first enzyme in degradation pathway I for pyridoxine

○Mugo Andrew N.¹, Kobayashi Jun², Mikami Bunzou², Ohnishi Kouhei³,
Yagi Toshiharu¹
(¹高知大農, ²京大院農, ³高知大遺伝子実セ)

15：59

E - 5 鶏卵白アルブミンをモデルとした Serpinopathy の研究

○田中俊平¹, 石丸隆行¹, 松富直利²
(¹山口大農, ²宇部フロンティア短大)

16：10

E - 6 エラープローン PCR による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の耐熱化

○松井祐土, 山川 匠, 村松久司, 永田信治
(高知大農)

座長：三本木至宏（広大院・生物圏）

16：21

E - 7 植物糖タンパク質フォールディング機構に関与する α -Glucosidase I の機能解析と遺伝子同定

○兵庫彬斗¹, 前田 恵², 木村吉伸²
(¹岡山大農, ²岡山大院・自然)

16：32

E - 8 植物抗原性糖鎖含有糖ペプチドの多量精製とヒト免疫修飾活性の解析

○眞野 彩¹, 前田 恵², 大槻剛巳³, 木村吉伸²
(¹岡山大農, ²岡山大院・自然, ³川崎医大・衛生)

16 : 43

E - 9 新生糖タンパク質フォールディングに関与する植物 α -Glucosidase II の精製と発現系構築

○村田翔平¹, 前田 恵², 木村吉伸²

(¹岡山大農, ²岡山大院・自然)

座長 : 小川雅廣 (香川大農)

16 : 54

E - 10 深海微生物由来 Cytochrome c_5 の安定性

○政成美沙¹, 若井 暁¹, 加藤千明², 為我井秀行³, 栗原達夫⁴, 三本木至宏¹

(¹広大院・生物圏, ²JAMSTEC, ³日大文理, ⁴京大・化研)

17 : 05

E - 11 粘液細菌 *Mycococcus xanthus* のマンガン依存性プロテインホスファターゼ Pph3 における
保存アミノ酸残基の機能解析

○森 裕美, 木村義雄

(香川大農)

市民フォーラム 講演要旨

安全な農薬をつくるために

京都大学大学院農学研究科 赤松 美紀

今年は東北で未曾有の大災害があり、タイでは洪水被害が深刻である。災害時であれ平時であれ、我々の生活にとって不可欠なものはやはり水と食料だろう。食料生産において農薬は重要な役割を担っている。医薬が私たちの病気を治す薬であるのに対し、農薬は作物の病気を治す薬であると言える。従って、作物を健康に保つために農薬が必要であることは言うまでもない。一方で、マスコミによる農薬に関する報道などから、農薬の安全性について疑問を抱いている人々が少なくないことも事実である。農薬開発に携わる人々は安全な農薬を作るために日々努力を重ねている。

演者は京都大学農学部農薬化学研究室(現在は生物調節化学研究室と名称変更している)の出身で、これまで農薬の選択性機構の解明および高選択性・高活性農薬の開発研究を行ってきた。その過程で、コンピューターケミストリーの手法に出会い、その手法を用いて実験データのさまざまな解析を行ってきた。特に、農薬などの化学構造と生物活性との間の関係を統計的に解析する構造活性相関の手法は、演者のかつての指導教授である藤田稔夫京大名誉教授とアメリカポモナ大学の Corwin Hansch 名誉教授が開発された手法で、演者のライフワークとなっている。また、近年はコンピューターの発展に伴い、タンパク質の分子モデリング、受容体への低分子のドッキングなどに用いられるさまざまなソフトウェアが開発され、演者も構造活性相関とともにそれらのソフトウェアを駆使し、農薬のデザインに役立てている。

本フォーラムでは、まず、農薬の「功」について述べ、安全な農薬をつくるために一般にどのような手法が用いられているかを解説し、聴衆の方々に農薬について正しく認識していただけるようにするとともに、演者のこれまでの研究について、その一端を紹介したいと思う。



昆虫アセチルコリン受容体(分子モデル)に結合した殺虫剤イミダクロプリドヒトと昆虫間の受容体構造の違いにより、イミダクロプリドの選択性が表れる

カビはどうやって発癌物質アフラトキシンを作るか

農研機構食品総合研究所

矢部 希見子

カビの中は抗生物質や食品色素など有用物質を生産するものも多くあるが、一方で、アフラトキシンやデオキシニバレノールなど、動物や人に有害な作用を示すかび毒（マイコトキシン）を生産するものも多く、これまでに300種以上のかび毒が報告されている。これらのかび毒の中で、最も発がん性が強く、また強力な急性毒性を有するものがアフラトキシンであり、アフラトキシンによる穀物汚染は世界において極めて深刻かつ重要な問題となっている。

アフラトキシンは主として *Aspergillus flavus* 及び *Aspergillus parasiticus* によって生産されるかび毒で、主として4種類のアフラトキシン誘導体、アフラトキシン B₁ (AFB₁)、B₂ (AFB₂)、G₁ (AFG₁)、G₂ (AFG₂) が生産される（図1）。

中でも AFB₁ は自然界で最も発がん性の高い物質であり、また最も生産量が多いことから、AFB₁ による穀物汚染の効果的防御法の開発が世界的に求められている。しかし、アフラトキシンは低分子で熱に極めて安定な物質であることから、一旦、穀物がアフラトキシンによって汚染されてしまうと、その無毒化は容易ではない。従って、穀物がアフラトキシンによって汚染されないよう、カビによるアフラトキシン生産を抑える方がより現実的な手段と考える研究者も多い。我々も、アフラトキシン生産の効果的防御技術の開発を目的として、長年、鳥取大学中島廣光教授との共同研究により、カビのアフラトキシン生産メカニズムの解明及びその生産阻害法の研究を行ってきた。その結果、アフラトキシン生合成経路が大変複雑な経路であること、その生合成経路の一部はアフラトキシン非生産菌においても広く利用されていること、さらにアフラトキシン生産を阻害できる物質の存在が明らかとなった。そこで、ここでは、これまで明らかになったアフラトキシンの生合成機構¹⁾ 及びアフラトキシン汚染防御法の開発への挑戦²⁾ について報告する。

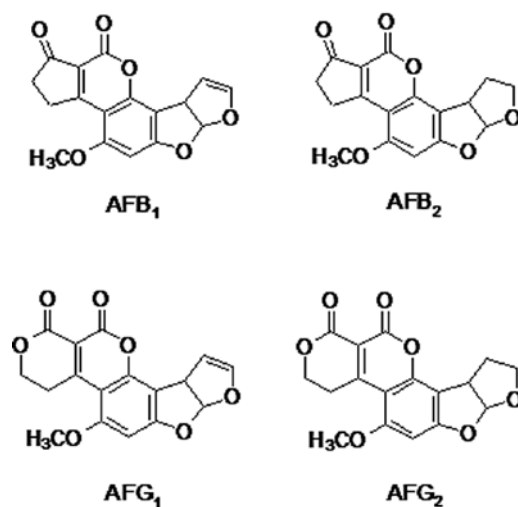


図1. カビが主として生産するアフラトキシン

¹⁾ 矢部希見子, 中島廣光「アフラトキシン生合成機構について」食品衛生学雑誌 52,135-147 (2011)

²⁾ K.Yabe et al. Isolation of microorganisms and substances inhibitory to aflatoxin production. Food Addit. Contam., Part A, 25, 1111-1117 (2008)

日本農芸化学会技術賞 受賞講演要旨

FAD グルコース脱水素酵素の発見と、それを応用した 新規血糖値センサの開発

池田糖化工業(株) 小村啓悟

糖尿病患者は世界で2億8500万人(2010年)存在すると見られ、その数は今後も増加の一途を辿り2030年には人口の約7%、4億3500万人に達すると推定されている。¹⁾患者数が多いのは西太平洋地域(約7700万人)と南東アジア地域(約5900万人)であり、それぞれ2030年頃に1億人を突破すると予測される。また、現在の有病率で見れば、北米地域(10.2%)、中東・北アフリカ地域(9.3%)が高いとされており、これらの地域・国家では深刻な医療費問題を引き起こしている。

糖尿病患者においては、日に数回血糖値を測定し、血糖値の高さに応じて投薬して血糖値を下げ、適正な値に日常管理する療法が用いられている。これにより、高血糖状態が続くことによる深刻な合併症(腎症、網膜症、神経障害、壊疽など)の発症を防ぐことが可能となっている。そのような療法において、日々通院するのではなく、日常から自身で血糖値センサを用いて血糖値を測定し、投薬できれば便利である上、細やかな血糖値管理を実現できる。しかしながら、2003年当時に市販されていた自己測定用の血糖値センサは、点滴を受けた患者が使用した場合、点滴中のマルトースの影響により血糖値が実際より高く測定・表示されてしまう問題があった。日本・米国の国家機関(厚生労働省・米国食品医薬品局[FDA])は本問題を重要視し、偽高値表示に伴う過剰投薬の結果、体内糖分が枯渇して昏睡、時に死に至る危険性を、正式通達にて指摘するに至っていた。²⁾⁻³⁾我々は、本問題の根本解決に向けた新規酵素の開発を行い、世界に先駆けた性能の血糖値センサを確立・実用化することに成功した。⁴⁾⁻⁵⁾



<参考文献>

- 1) International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas 4th edition (2009).
- 2) US Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm150453.htm> (posted 2005).
- 3) 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/i-anzen/hourei/dl/050207-1.pdf> (2005).
- 4) S. Tsujimura, S. Kojima, K. Kano, T. Ikeda, M. Sato, H. Sanada, and H. Omura; Novel FAD-dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-insensitive Glucose Biosensor: Biosci Biotechnol Biochem. 70, 654-659 (2006).
- 5) 中南貴裕: 血糖自己測定システム: バイオ電気化学の実際 池田篤治(編), CMC出版, 172-184 (2007).

一 般 講 演 要 旨

A - 1 酵母の発酵特性に対するサンショウの作用 (2) 加熱処理条件の影響

○小野みどり¹, 藤原 誠², 松元信也^{1,2}

(¹ 高知工科大工・物質・環境, ² 高知工科大院・物質・環境)

【目的】 演者らはサンショウを適量添加すれば、酵母の発酵が促進されることを明らかにした¹⁾。発酵速度が速くなるということは、工業規模でのアルコール発酵において最も懸念される雑菌汚染現象の発現抑制策として有用である。ただ、一方では農産物であるサンショウに由来する雑菌の混入による汚染現象発現の恐れがある。そこで、ここでは発酵系に添加するサンショウに加熱処理を施した場合、促進作用がどのような影響を受けるのか検討した。

【方法】 《加熱処理条件》サンショウの果皮もしくは種子粉碎物を 80℃, 100℃, 121℃ で乾熱処理、もしくは 121℃ で湿熱処理した。処理時間はいずれも 20 分間とした。《発酵試験法》YPD 培地に処理されたサンショウ試料と酵母培養液の所定量を加えて、28℃ で静置発酵させた。発酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定した。発酵終了後は pH, 総酸, 菌数, アルコールなどを測定した。

【結果】 ①サンショウの果皮及び種子を 80℃ ~ 121℃ の範囲で乾熱処理しても、酵母に対する発酵促進作用は維持されていた。②加熱処理法としては乾熱, 湿熱のいずれの処理法を採用しても実用上支障はないことが判明した。③従って、アルコール発酵の高効率化などのためにサンショウの果皮や種子を使用する場合、雑菌汚染防止策として加熱処理法の採用が可能であることが知られた。

1) 藤原誠, 高橋永, 松元信也: 日本農芸化学会中四国支部第 29 回講演会講演要旨集, p32 (2011)

A - 2 サンショウを利用した発酵促進剤の開発

○藤原 誠¹, 小野みどり², 松元信也^{1,2}

(¹ 高知工科大院・物質・環境, ² 高知工科大工・物質・環境)

【目的】 サンショウの微生物に対する作用特性を研究する中で、サンショウの示す発酵促進作用には揮発成分も関与しているとの知見を得た。そこで、演者らはその知見を応用して、サンショウの揮発成分を利用した発酵促進剤を開発することを意図した。ここでは、サイクロデキストリンやイオン交換樹脂を基材とする発酵促進剤の試作とそれらの評価結果について報告する。

【方法】 《発酵促進剤の調製方法》同一容器内にサンショウ粉碎物と基材を所定の比率で置き、室温で所定時間放置したものを発酵促進剤試料とした。サンショウは果実もしくは果皮を用い、基材はサイクロデキストリン (α , β , γ) もしくはイオン交換樹脂 (IRC76) を用いた。サンショウと基材の比率は重量比で 1 : 1 から 1 : 0.001 まで変化させ、放置期間は 3 時間から 30 日間とした。《発酵試験法》所定の培地に、調製した発酵促進剤試料とスターターの所定量を加えて、28℃ で静置発酵させた。微生物は酵母もしくはザイモナス属細菌を用いた。発酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定した。発酵終了後は pH, 総酸, 菌数, アルコールなどを測定した。

【結果】 ①基材であるサイクロデキストリンもしくはイオン交換樹脂にサンショウの揮発成分を包接、吸着させた製剤は酵母ならびにザイモナス属細菌の発酵を顕著に促進する発酵促進剤として機能することが判明した。②発酵促進剤調製のための基本操作条件を明らかにした。

A - 3 微生物の発酵特性に対するアミグダリンの作用

○西澤和展, 喜田和亨, 松元信也
(高知工科大院・物質・環境)

【目的】 ビワ種子の添加量が増すにつれて発酵が促進されたが, 大量に添加した場合は, 特に発酵初期において発酵が抑制される傾向を示した。そこで, 本研究ではビワ種子の添加量と発酵の促進/抑制の関係に関する機構を明らかにする一環として, ビワ種子中の代表的なフィトケミカルであるアミグダリンに注目し, その微生物に対する作用特性を明らかにすることを試みた。

【方法】 所定の培地に, 所定量の試薬アミグダリン(東京化成工業製)と酵母もしくはザイモモナス属細菌を添加して, 所定の温度で静置発酵させた。発酵中は経時的に炭酸ガス発生量を測定し, 発酵終了後はpH, 総酸, 菌数, アルコールなどを測定した。

【結果】 ①28℃発酵の場合, 低濃度領域ではアミグダリン濃度が低いほど炭酸ガス発生量が多く, 発酵は促進される傾向にあったが, 濃度が極端に高い場合は, 発酵は逆に抑制される傾向を示した。②アミグダリンによる発酵促進度は, 酵母よりもザイモモナス属細菌の方が大であった。③アミグダリンの酵母およびザイモモナス属細菌の発酵特性に及ぼす影響は, 発酵温度によって大きく異なった。④アミグダリンによる酵母およびザイモモナス属細菌に対する発酵促進もしくは抑制作用は細胞当りの代謝活性の亢進もしくは抑制に起因する可能性が示唆された。⑤ビワ種子の添加による発酵促進もしくは抑制はビワ種子中に含まれるアミグダリンに起因することが示唆された。

A - 4 バイオエタノールの省エネルギー的高効率発酵システムの開発(8) 細菌による通気式アルコール発酵システムに関する検討

○梶原秀一¹, 仲上将央², 西澤和展¹, 松元信也^{1,2}

(¹高知工科大院・物質・環境, ²高知工科大工・物質・環境)

【目的】 バイオエタノールは省資源的かつ高効率に発酵製造することが必須の命題である。演者らは, これまでの知見情報から, ザイモモナス属に代表されるアルコール発酵細菌による発酵の高効率化を達成する一手段として, 通気式アルコール発酵システムを構想した。ここでは, 本システムの実用化を指向する一環として, 通気条件, 培地組成, 菌種の影響について検討を加えた。

【方法】 発酵試験方法: 所定の培地に, 所定量のスターターを加え, 混合, 攪拌後, 28℃で発酵させた。細菌はザイモモナス属細菌を基本とし, 必要に応じてザイモバクター属細菌も検討した。発酵方法はコントロールとしての静置発酵法と通気手段の異なる2種類の通気発酵法, すなわち通気手段としてエアポンプを用いる方法(AP通気法)とマイクロバブル発生装置を用いる方法(MB通気法)について検討した。通気条件は間歇通気を基本とし, 通気量はAP法では0.4vvm, MB法では0.3vvmとした。また, 実験目的に応じて発酵系に所定量の種子類やフィトケミカルを添加した。

【結果】 ①エアポンプ, マイクロバブル発生装置のいずれの通気手段で間歇通気しても, ザイモモナス属細菌の発酵は, 静置発酵法の場合より著しく促進された。②通気発酵系に種子類やビワ種子中の代表的なフィトケミカルであるアミグダリンを添加すると, 無添加の場合に比べて, アルコール発酵細菌の発酵は一層促進された。

A - 5 *Hydrogenophilus* 属細菌の高温環境での広域な分布を支える酸化的リン酸化

○若井 暁¹, 西原宏史², 三本木至宏¹
(¹ 広大院・生物圏, ² 茨城大・農)

【背景】好熱性の *Hydrogenophilus* 属細菌は、独立栄養的にも従属栄養的にも生育でき、地球上の高温環境に広く存在することが示されている。この広域な分布は菌株の分離およびメタゲノム解析により明らかにされているが、高温環境で広く生き抜くために必要なエネルギー代謝の中核である酸化的リン酸化に関する知見は得られていない。

【結果および考察】*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株を水素で独立栄養的に培養し、得られた菌体から膜画分を調製した。膜画分は、NADH でのプロトン輸送活性に加えて、本菌の従属栄養基質であるコハク酸や乳酸に依存したプロトン輸送活性を持っていた。これは、水素培養菌体でも、従属栄養による生育が可能であることを示している。無機栄養源および有機栄養源を常に利用できる能力は、エネルギー源の供給が不安定な自然環境では有利に働くはずである。また、膜画分の ATP 加水分解活性は至適温度 65℃ と好熱性を示し、 F_1F_0 -ATP 合成酵素の特異的阻害剤である DCCD により阻害された。DCCD による阻害率は低温よりも生育温度 (50℃ 以上) で高いことが分かった。この結果は、 F_1F_0 -ATP 合成酵素の共役が本菌の生育温度で効率化することを意味している。*Hydrogenophilus* 属細菌は、多様な栄養源から始まるエネルギー代謝を ATP 合成酵素に集約している。柔軟なエネルギー獲得系に加えて、高温で効率化した酸化的リン酸化によって、*Hydrogenophilus* 属細菌は広域な高温環境に分布していると考えている。

A - 6 食品由来成分による歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム抑制

○高棕美紀¹, 松永哲郎¹, 池田知代¹, 會見忠則², 加藤昭夫¹, 阿座上弘行¹
(¹ 山口大農, ² 鳥取大農)

E. corrodens は歯周病原性細菌の一つとして知られ、単独でもバイオフィルムを形成する。本研究では、本菌のバイオフィルム形成に及ぼすカテキン類の阻害効果について調べた。バイオフィルム形成は、1 mM のピロガロール型の B リングやガロイル基をもつカテキン類の添加により阻害された。しかしながら、これらのカテキン類の中にはこの濃度では抗菌活性を示さないものもあった。さらに、没食子酸は抗菌活性なしにバイオフィルム形成を阻害した。これらの結果より、ある種のカテキン類は最小生育阻害濃度以下でバイオフィルム形成を阻害できることが示唆された。さらに、最小生育阻害濃度以下でのカテキンによるバイオフィルム阻害は *luxS* 欠損変異株では見られなかった。したがって、ガロイル基をもつカテキン類がオートインデューサー 2 を介したクオラムセンシングに影響を与え、これによってバイオフィルム形成を阻害することが示唆された。

さらに、7 種の食用きのこの子実体を水やメタノールで抽出し、*E. corrodens* のバイオフィルムを抑制する成分の検索を行った。その結果、シイタケのメタノール抽出物、ヤマブシタケの水抽出物にバイオフィルム抑制が見られた。また、ヤマブシタケの水抽出物を 100℃、15 分加熱処理したものでは抑制が見られなかったことから、ヤマブシタケに含まれるタンパク性の成分がバイオフィルムの抑制に関与することが示唆された。一方、シイタケのメタノール抽出物では添加量に依存してバイオフィルム形成が抑制された。現在、これらの抽出物に含まれる成分の精製を行っている。

A - 7 ポリフェノール酸化物の新機能

— α -グルコシダーゼ, キサンチンオキシダーゼ阻害能と活性物質—

新開愛美, ○藤本 彩, 中村光裕, 増田俊哉
(徳島大院・総合)

【目的】近年, ポリフェノールは, 植物性食品における健康機能性物質として重要視されている。ポリフェノールはそれ自体の抗酸化性が強いことからわかるように, 非常に酸化的变化を受けやすい物質である。我々は, 食品中や生体中でポリフェノールが必然的に示す性質として, ポリフェノールからの酸化物の機能を検討してきた。¹⁾ 本研究では, ポリフェノール酸化物の α -グリコシダーゼおよびキサンチンオキシダーゼの阻害能を測定し, 酸化の結果増強された活性を示したものについて, 酸化物中の活性物質の特定を試みた。【方法・結果】鉄触媒空気酸化において酸化された22種のポリフェノール酸化物の α -グリコシダーゼおよびキサンチンオキシダーゼの阻害能を測定し, 元のポリフェノールの活性と比較した。その結果, カテキン他10種のポリフェノール酸化物に100 μ M相当量において酵母由来の α -グリコシダーゼ阻害活性の増強作用が確認された。しかし, ラットの小腸顆粒の α -グリコシダーゼの阻害能を測定したところ, どのポリフェノールにも活性を確認することができなかった。一方, 痛風発症の鍵酵素であるキサンチンオキシダーゼの阻害能を測定したところ, レスベラトロール, ロスマリン酸, カフェ酸の酸化物に増強効果を確認した。それらの酸化物中の活性増強に寄与する物質の構造同定を行った。

¹⁾ Shingai Y, Fujimoto A et al. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8180 (2011)

本発表は JST の 23 年度 A—Step 研究 (代表者増田) の成果の一部を報告したものである。

A - 8 ピーマンにおけるフラボノイド生合成に対する光の影響

○手林慎一¹, 吉田勝平², 大西信太郎³

(¹高知大・農, ²高知大・理, ³愛媛連大・農)

【目的】演者らはピーマン (*Capsicum annuum*) の葉にハモグリバエに対して産卵阻害活性を示すルテオリン二配糖体 (Luteolin 7-*O*- β -apiosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glucoside) が多量に蓄積されることを報告している。アグリコンであるルテオリンは抗酸化活性や抗炎症作用などの薬理作用が報告されていることから健康食品などへの利用が検討され, ピーマンの葉を利用したルテオリン生産への期待が高まっている。ところが現在栽培されている主要なピーマン品種ではルテオリンの蓄積量が低く, またアピゲニンを副生することも報告されている。そこで本研究ではピーマン栽培における光条件とフラボノイド生産性の関連を調査することでルテオリン高生産技術の可能性探索を行った。

【方法・結果】双葉期のピーマン (品種:京波) 苗を人工気象器内で4種類の波長変換フィルム (赤:青~緑色光を吸収し赤色を発光, 黄:紫色光を吸収し黄色を発光, 青:紫外領域を吸収し青色を発光, 近赤外:青~橙光を吸収し近赤外光を発光) の被覆下で2週間栽培し (25 \pm 3 $^{\circ}$ C, 16L:8D), メタノールで抽出し, HPLC でアピゲニン配糖体及びルテオリン配糖体を定量した。その結果, すべてのフィルム処理においてもルテオリン含有率の上昇が確認された。一方, アピゲニンおよびルテオリンの総含有量は黄色・赤色蛍光フィルム被覆では増大し, 青色・近赤外蛍光フィルム被覆では減少していた。これらのことからピーマンの葉では赤色光がルテオリンの蓄積を促進することが判明した。

A - 9 フェルラ酸配糖体の合成とラジカル捕捉能について

○澤田佳帆¹, 榎間由幸¹, 藤井雄三¹, 土江松美²
(¹米子高専 物質工学科¹, 阪市大院理²)

【目的】 活性酸素は、ヒトの細胞内で発生し、遺伝子や生体膜などに損傷を与える。健康を維持するためには、一次予防として活性酸素を日頃から除去することが重要である。そこで我々は、コメに含まれる天然物のフェルラ酸に注目した。これまでの研究から、フェルラ酸は活性酸素を除去すること、抗菌活性を有することが報告されている。しかし、水溶性が乏しいことが課題となっている。そこで我々は水溶性の高い糖に注目しフェルラ酸の配糖体化の分子設計と合成を行った。合成した配糖体のラジカル消去活性評価は分光学的に測定できる 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて行った。また、配糖体の水溶性を確かめるために水溶性が向上するか検討を行った。

【結果, 考察】 DPPH はラジカルが捕捉されると極大吸収 λ_{\max} 517 nm が低下する。測定を行ったところ、極大吸収が、ブランクに対して 71 % 減少した。この結果より合成したフェルラ酸配糖体は強いラジカル捕捉能を有していることが示唆された。また水溶性について比較を行ったところ、フェルラ酸は 5 mL の水を加えても溶けなかったが、フェルラ酸配糖体は、2 mL の水に溶解することを確認した。

A - 10 睡眠病治療薬ケロノプシンのフラグメント A, B の合成研究

○下寄康裕, 兵江駿一, 野口太郎, 榎間由幸
(¹米子高専 物質工学科)

【目的】 睡眠病は、鞭毛虫 *Trypanosoma brucei* が寄生することによって睡眠障害を誘発する感染症である。治療薬には様々な薬剤が用いられているが、いずれも副作用等の問題を抱えており、新規治療薬の開発が急がれている。そこで、*Pseudomonas rubra* が生産する自己防御物質ケロノプシンの生理活性が新規治療薬として、有用性が期待されている。本研究ではケロノプシンの全合成を目指し、3つのフラグメントに分け合成した後、収束合成を計画した。今回フラグメント A, フラグメント B の合成を検討した。

【方法・結果】 フラグメント A の合成は、デヒドロ酢酸に、加熱還流により調整したマグネシウムメチラートを作用させ、ケト体を収率 73% で得た。得られたケト体をメタノールに溶解させ、酢酸銅 (II) 水溶液を添加し銅錯体を収率 89% で得た。銅錯体を水素化ナトリウムとヨードメタンを添加し選択的にメチル基の導入を行ない、メチル化体を収率 70% で得た。メチル化体と強塩基であるジアザピシクロウンデセンを加熱還流し、フラグメント A であるピロン環の合成を達成した。フラグメント B については、出発物質の 2,4-ヘキサジイン 1,6-ジオールを水素化リチウムアルミニウムによってジアルキンをジアルケンに還元し、ジアルケンを受率 92% で得た。現在、水酸基を *tert*-ブチルジメチルクロロシランで保護し、Swern 酸化により、フラグメント B の合成を検討している。

A - 11 イオン液体を用いた木質成分・リグニンの分解反応

○本田望実¹, 榎間由幸¹, 渡辺隆司², 吉岡康一²
(¹米子高専 物質工学科, ²京都大学 生存圏研究所)

【目的】世界中で石油資源の枯渇が問題視されている。現在行われている対策として風力発電や太陽光発電などが挙げられるが、これらは炭素資源ではないため石油資源の代わりになると言えない。そこで、再生可能な生物由来の有機性資源である木質バイオマスに注目した。主に木はセルロース、ヘミセルロース、リグニンから構成されている。このセルロースとヘミセルロースは、紙やバイオ燃料の成分であり、これらを最大限に利用するためにはリグニンの除去が必要である。そこで、イオン液体（以下 IL）を用いたリグニンの除去を検討した。

【方法・結果】 ボールミルユーカリと市販のリグニンモデルをそれぞれ 1-ブチルピリジニウムブロミド ([Bpyr]Br)、1-ブチル-3-メトキシイミダゾリウムテトラクロロフェラート ([BMIM]FeCl₄) と 1-エトキシ-3-メトキシイミダゾリウムテトラクロロフェラート ([EMIM]FeCl₄) を用いて、マイクロ波照射を行い、木質バイオマスの分解を行った。この時、マイクロ波照射による効果の比較としてオイルバスによる加熱を [Bpyr]Br と [BMIM]FeCl₄ を用いて行った。分解処理を行った残渣は SEM、抽出液は GCMS 測定を行い、リグニンが分解したか確認した。外部加熱であるオイルバスによる加熱は IL を分解されてしまい又、表面のみ加熱されるためマイクロ波照射よりも大きな空孔が確認された。一方、内部加熱であるマイクロ波照射は金属イオンを含有した IL を用いると、反応性が向上され、リグニンの分解が効率良く進んでいることが GCMS より確認することができた。

A - 12 糸状菌 *Fusarium oxysporum* が生産するアフラトキシン生合成阻害物質

○川元彩香¹, 石原 亨², 矢部希見子³, 中島廣光²
(¹鳥取大院・農, ²鳥取大・農, ³食総研)

【目的】アフラトキシン (AF) は、*Aspergillus flavus* や *A. parasiticus* などの糸状菌が生産する発ガン性のマイコトキシンである。農作物の AF 汚染は甚大な健康的、経済的被害をもたらすことから世界的な問題となっており、その有効な防除法の開発が強く望まれている。我々はこれまで AF 生合成中間体である赤色素 norsolorinic acid (NA) に着目し、糸状菌由来の NA 生成阻害物質を検索してきた。今回、土壌より分離した *Fusarium oxysporum* の一菌株の代謝産物に NA 生成阻害活性を見出したのでその構造と阻害活性について報告する。

【方法・結果】*A. parasiticus* NFRI95 は AF を生産せず NA を蓄積する変異株である。この菌株を代謝産物を含む培地で培養したときのコロニーの着色の有無により、代謝産物の NA 生成阻害活性を判定した。鳥取県内の土壌から分離した糸状菌 7 株を麦芽培地で培養し、その代謝産物の NA 生成阻害活性を調べた。NA 生成阻害活性を示した糸状菌 *F. oxysporum* (MJ4 株) を麦芽培地で培養後、培養濾液の酢酸エチル抽出物を各種クロマトグラフィーで精製し阻害物質を単離した。単離された阻害物質は 1000 mg/L で NA 生成阻害活性を示し、各種機器分析データからフザリン酸と同定された。メチルエステルをはじめとするフザリン酸の誘導体をいくつか調製してその NA 生成阻害活性を調べたところ、フザリン酸エチルエステルが 100 mg/L から NA 生成阻害活性を示し、最も阻害活性が強いことが分かった。

B - 1 芋や栗の加工処理後に得られる規格外品を用いた焼酎醸造法の検討

○村上 潤¹, 加藤麗奈², 上東治彦², 村松久司¹, 永田信治¹
(¹高知大・農²高知県工技セ)

【目的】近年本格焼酎の消費量は清酒を抜く勢いで年々増加しており酒造メーカーでも様々な焼酎が芋や粟麦米などを原料として造られている。一方高知県で生産するサツマイモや栗は焼酎以外に芋けんぴや菓子製造にも利用されているがその製造過程で生じる大量の規格外品や不要部位は廃棄されている。そこで本研究では①芋けんぴ製造でサツマイモの油揚げ後や砂糖を添加した後に出る規格外品を利用した芋けんぴ焼酎②菓子製造の過程で出る栗の不要部位を利用した栗焼酎など地場産品の廃棄物の再利用を目的とした焼酎醸造法の諸条件について検討した。

【方法・結果】焼酎の製造方法はまず1次モロミで仕込水に白麹乾燥酵母 S-2 を入れて 25℃ で 5 日間発酵させた。次に2次モロミで仕込水と原料を加えて25℃で7日間発酵させた後に蒸留を行った。①芋けんぴ焼酎については麹量芋けんぴの添加形態蒸留方法について最適な製造条件を検討した。その結果麹歩合 54% で芋けんぴは無蒸煮のままモロミは遠心分離せずに減圧蒸留することによって得られた芋焼酎が他の方法で製造した芋焼酎よりも豊富な香気成分を持ち官能試験において最も良い評価を受けた。②栗焼酎については栗のペースト採取後の残渣とその後に生じる焦げの部分を用いた仕込みを行いペースト化した皮を含まない栗を用いた仕込みとの比較を行った。その結果残渣や焦げの部分を用いた焼酎は皮を含まない栗を用いた焼酎に比べて香気成分の量的な低下が見られたが官能試験では味が濃厚で優れていると評価された。

B - 2 野生酵母と乳酸菌の培養に適したヤーコンやトマトを用いた低コスト製パン法

○藤本ゆかり¹, 茂野光正², 坂本奈穂¹, 須藤千賀¹, 木村有希¹,
金子美幸¹, 柳 裕子¹, 村松久司¹, 永田信治¹ (¹高知大・農,²ベーカーリー・ペロリ)

【目的】製パンや醸造に用いる酵母は、糖分解による炭酸ガスやアルコールの生成と、味や香りに関わる成分を生成する役割を持つ。これまでに発酵力が強く製パンに優れた酵母をクチナシ、ヤマモモ、マコモの植物資源やキリン、チンパンジーの腸内環境から分離し、官能試験で評価されるパンを市販化してきた。しかし、店頭で培養した野生酵母を低温で静置沈殿させた湿菌体は、市販のパン酵母に比べて10倍以上のコスト高となる。本研究では、発酵種に適した植物素材から分離した野生酵母を、それを分離した素材で培養した発酵種を用いた低コストの製パン法を検討した。

【方法・結果】ヤーコンやトマトの自然発酵物から嫌気条件で、クロラムフェニコール添加培地で生育する酵母と、シクロヘキシミド添加培地で生育する乳酸菌を分離した。乳酸菌は生理学的試験と塩基配列で同定し、酵母はYM15培地での振とう培養、静置培養、低温静置培養での発酵試験とショ糖や麦芽糖に対する発酵試験を行った。小麦粉を用いた生地膨張力試験を0～30%のショ糖存在下で行い、製パンに適する野生酵母を選択した。野生酵母は塩基配列で同定し、中種法で作る食パンで官能試験を行った。生地膨張と官能試験の結果から、ヤーコン酵母 YKR325 とトマト酵母 CHI2305 を選択し、これら野生酵母の低温保存性やヤーコン粉砕物とトマトジュースでの生育特性を評価した。食用 YM 培地で培養した両酵母をヤーコン粉砕物とトマトジュースで培養した発酵種で作製した食パンは、味、甘み、色に特徴がある美味しいパンと評価され、野生酵母の発酵種を用いた低コストの製パンが可能であった。

B - 3 餌料への添加を目的とした乳酸菌の探索とペットへの摂取効果の検討

○木村有希¹, 穴井直博², 井上寿子¹, 坂本奈穂¹, 柳 裕子¹, 松尾知佳¹
村松久司¹, 永田信治¹ (¹高知大・農²アミール動物病院)

【目的】 乳酸桿菌は自然界や動物の腸管などに広く生息しており発酵食品への利用やそれを摂取する宿主の健康維持を実現する上で重要な機能性素材であると言える。本研究では①動物園で飼育されている動物の腸内環境に見出される乳酸菌②果実など様々な植物の自然発酵中に見出される乳酸菌③食品加工で生じる廃棄物の発酵中に見出される乳酸菌を分離し伴侶動物の健康管理を目的としたプロバイオティクスを実現するためにその摂取方法と摂取効果の評価を試みた。

【方法・結果】 ①動物園で飼育する様々な動物の新鮮便②野菜や柑橘類の自然発酵物特に乳酸菌の増殖に有利なトマトやヤーコン③ユズの搾汁残渣や栗焼酎粕等の食品廃棄物を分離源として嫌気条件化でシクロヘキシミドを添加した MRS 培地を用いて乳酸菌を分離した。単離菌はグラム染色法と顕微鏡観察によって乳酸桿菌を選別し 16SrDNA の塩基配列解析による菌の同定グルコースやグルコン酸ナトリウムを炭素源とするガス産生試験種々の糖類資化性試験高濃度グルコース存在下で生産するホモ多糖の有無胃酸胆汁耐性試験抗菌活性試験と生育条件の検討を行った。以上の結果より餌料への添加と摂取に適当と予測される乳酸菌を用いてアミール動物病院に通院する小型犬を対象に乳酸菌の定期的な投与と新鮮便の採取を行った。乳酸菌の培養菌体を添加した餌料を 1 日 1 回 2 週間与え投与前・中・後の新鮮便を用いて投与した乳酸菌の検出と排泄物中のアンモニア濃度オーナーによる便の性状や排便状況の観察を行った。

B - 4 β -1,3-グルカン β -1,6-グルカンの定量に適した β -グルカナナーゼの探索と評価

○松岡靖子¹, 高本裕果¹, 清野由佳¹, 宮脇香織^{1,2}, 中谷麻衣^{1,2}, 松尾知佳¹
平尾智美¹, 村松久司¹, 永田信治¹ (¹高知大・農²ソフィ)

【目的】 β -1,3-1,6-グルカンは酵母の細胞壁や担子菌の子実体の形成に関与し黒酵母では菌体外に生産される様々な機能を持つ微生物多糖である。これらの β -グルカンは土壤中の微生物が持つ β -グルカナナーゼで分解されるが多様な構造を有することから単糖まで完全分解して定量することが困難だとされている。そこでこれを分別定量できる β -グルカナナーゼが必要になる。本研究では β -1,3-グルカンと β -1,6-グルカンの定量に適した酵素を生産する微生物の探索酵素の β -グルカンに対する分解能力の評価 β グルカン定量への適用性について検討した。

【方法・結果】 パン酵母菌体リケナンカードランパスツラン黒酵母グルカンを含む培地で生育したコロニーのハロ形成やコンゴレッド染色によって β グルカン分解菌を選択した。顕著な β グルカン分解活性を示した細菌 H1 放線菌 SY26 真菌 BRN 放線菌 IKM 細菌 MCK-W3 はパン酵母菌体培地で培養することで β -グルカン分解活性を持つ酵素を菌体外に分泌した。酵素の精製は遠心分離で菌体を除いた培養液から濃縮硫酸沈殿種々のイオン交換クロマトグラフィーによって活性画分を分離した。また種々の多糖に対する反応性薄層クロマトグラフィーを用いた分解物の分析ゲル電気泳動で分離したタンパク質の活性を調べることで菌体が生産する β -グルカナナーゼの種類とその特性を明らかにした。これらの酵素もしくは培養液を用いて特異的で精度の高い β -1,3-グルカン β -1,6-グルカンの簡便かつ特異的な定量が可能かどうかを検討した。

B - 5 分裂酵母の非性的凝集に関わる *czf1* 遺伝子の解析

○景山瑤子, 大石和義, 大渡康夫, 川向 誠
(島根大・生物資源)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は栄養源枯渇条件下において体細胞分裂サイクルを G1 期で停止させ G0 期に進行するか有性生殖過程へと移行する。そのメカニズムを解明するため栄養培地上でも接合胞子形成を行う *sam2* 変異株の解析を進めている。そのうち *sam2* 変異株が CaCl_2 感受性を示すことからその CaCl_2 感受性を抑圧する遺伝子をスクリーニングにより取得し取得した遺伝子を *czf1* (Ca^{2+} sensitive zinc finger) と命名した。Czf1 は典型的な Zn2-C6 型ジンゲフィンモチーフを有する核局在性タンパク質であることから転写因子であると推定している。この *czf1* 遺伝子が *sam2* 変異の原因遺伝子であるかを明確にするため次世代シーケンスにより *sam2* 変異全ゲノム解析を行った結果 *czf1* にはその上流下流領域を含め変異が入っておらず *czf1* は *sam2* 変異の原因遺伝子ではないことが明らかとなった。

次に $\Delta czf1$ 株を作成したところ非常に強い凝集性が見られることを見いだした。この $\Delta czf1$ 株の凝集性は接合型に依存しない非性的な凝集でありその凝集は EDTA やガラクトースの添加により阻害された。また $\Delta czf1$ 株は 0.25M CaCl_2 や 8mM HU に感受性を示したが接合率には大きな変化なく細胞はやや長く増殖能や生存率は野生株とあまり変わらなかった。

これらの結果から *czf1* 遺伝子はこれまでに解析がなされていない新規な遺伝子で Ca^{2+} や HU 感受性と非性的凝集に関与する機能を有することを見出した。

B - 6 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* における誘導的オートファジー

○弥生貴裕, 渡邊 彰, 麻田恭彦
(香川大農)

【目的】 オートファジーとは、細胞内に表れたオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体が細胞質タンパク質やオルガネラを大規模に包み込み、その内容物を液胞/リソソームを介して分解する、いわば真核生物のバルクの分解システムである。オートファジーは、細胞内品質管理などのため、通常状態においても低いレベルで起こっていると考えられているが、栄養源飢餓などの要因により、誘導的に起こることが知られている。本研究では、担子菌キノコにおける誘導的オートファジーについて、そのモデル生物である *Coprinopsis cinerea* のオートファゴソーム構成タンパク質 CcAtg8 の局在から解析を行った。

【方法・結果】 *Ccatg8* のプロモーターの下流に、[*Ccatg8* の最初のイントロンを含む領域]-[緑色蛍光タンパク質遺伝子(*Acfp1*)]-[*Ccatg8cDNA*] を挿入し、AcGFP1 と CcAtg8 の融合タンパク質を発現するような発現プラスミドを構築した。上記発現プラスミドを導入した *C.cinerea* 株を用い、解析を行ったところ、栄養源が豊富な栄養培地では緑色蛍光の液胞への蓄積は観察されないものの、低栄養条件下、ラパマイシンを添加した栄養培地条件下、そして EDTA を添加した栄養培地条件下において、3 時間後、緑色蛍光の液胞への顕著な蓄積が観察された。このことは、*C.cinerea* のオートファジーが上記条件下において誘導されることを示唆するものである。現在、種々の栄養条件の影響についてさらに解析を進めている。

B - 7 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はファージ感染により高病原化する

○山田和範, 加藤昭夫, 阿座上弘行
(山口大農)

E. corrodens は歯周病原性細菌の一つで, 菌体表層レクチンが本菌の病原性に大きく関与する。我々は臨床分離株の一つから線状ファージ由来のプラスミドを発見し, それにコードされたリコンビナーゼ遺伝子を導入することにより, 線毛遺伝子領域を含むゲノムが大きく再編することを報告した。さらに, このゲノム再編により, 線毛の消失に伴うコロニー形状の変化が見られ, またレクチン活性, バイオフィーム形成能, 溶血活性, 増殖速度, 炎症性サイトカイン誘導能などの病原性の指標が上昇することを明らかにした。今回は, 本菌のゲノム再編による高病原化が口腔内において普遍的に起こり得るのか, またゲノム再編のメカニズムについて調べたので報告する。

国内外から分離された臨床分離株7株にリコンビナーゼ遺伝子を導入した。その結果, 4株にゲノム再編が見られたが, 3株では認められなかった。また, ゲノム再編の見られた4株はいずれもコロニー形状の変化が見られ, レクチン活性, バイオフィーム形成能, 溶血活性, 増殖速度, サイトカイン誘導能が上昇していた。したがって, ゲノム再編による高病原化がファージ感染などによって口腔内で頻繁に起こっている可能性が示唆された。また, ゲノム再編が見られた株は全てゲノム中に線状ファージの配列を含んでいたことから, かつてファージ感染を受けた株が再度感染を受けることによって高病原化する可能性が示唆された。さらに, 分離された地域性によって組換え株の検出頻度が異なっていたことから, ファージの感染が水平伝播により広がったことも示唆された。

B - 8 大腸菌を宿主とした放線菌由来 ϵ -リジンアシラーゼ発現条件の検討

○黒木健太郎¹, 田口友造², 内田達也², 今村維克², 今中洋行², 中西一弘³
(¹ 岡山大・工・生物機能, ² 岡山大・院・自然, ³ 中部大・応用生物)

【目的】 当研究室では放線菌 *Streptomyces mobaraensis* の培養上清から各種アシラーゼを見出しその特性解析遺伝子解析各種微生物を宿主とする発現系の構築に焦点を絞って研究を行ってきた。一方放線菌由来のタンパク質は大腸菌を宿主とした組み換えタンパク質発現を行った場合宿主間のコドン使用頻度差などにより活性体を得ることが困難である。そこで本研究では放線菌由来 ϵ -リジンアシラーゼ遺伝子を対象として様々な条件での発現実験及び解析を行い最適な培養条件を検討した。

【方法・結果】 大腸菌宿主の菌株コドン培養条件などの因子がタンパク質の発現量および活性に及ぼす影響について調べた。発現解析は SDS-PAGE 酵素活性は可溶性サンプルを用いた酸性ニヒドリン法により測定した。その結果検討した全ての条件において野生型 *Sm*-ELA の発現・活性はみられなかった。しかし5'末端付近に存在するレアコドンを改変した遺伝子あるいはコドンを最適化した人工遺伝子を発現させた場合タンパク質発現量可溶化率および活性が向上することがわかった。さらに LB 培地を基準とした Glucose の添加 Yeast extract Tryptone 濃度について検討を行いタンパク質の発現量および活性を顕著に増加させる条件を見出した。したがってコドン改変による遺伝子転写効率の向上および培地組成の最適化によってタンパク質の発現量および活性体形成を大幅に改善できることが強く示唆された。

B - 9 分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 のテロメアにおける機能解析

升田賢太, 高橋克典, ○上野 勝
(広島大学・院・先端物質)

我々は分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 の二重変異株はテロメアが DNA 組換えで維持されることや微小管阻害剤に感受性になることを発見している (高橋ら Mol. Cell. Biol. 2011)。微小管阻害剤は抗癌剤として使用されているのでヒトで同様のことが起こればテロメア維持の阻害によって抗癌剤の作用を増強させる新しい技術の開発につながる可能性がある。そこで分裂酵母テロメア結合蛋白質 Pot1 とヘリケース Rqh1 の二重変異株が微小管阻害剤感受性になる原因の解明を本研究の目的とした。

【方法】 分裂酵母 pot1 rqh1 二重変異株の微小管阻害剤感受性を抑圧する変異株を探索した。

【結果】 分裂酵母 pot1 rqh1 二重変異株に DNA ダメージチェックポイント蛋白質である chk1 を破壊すると微小管阻害剤感受性が抑圧されることを発見した。pot1 rqh1 二重変異株はテロメア間での組み換え中間体が染色体分配時にも蓄積している。一方 pot1 rqh1 chk1 三重変異株はテロメア間での組み換え中間体が染色体分配時に蓄積しないことがわかった。これらのことから Chk1 はテロメアの組換えを促進することで pot1 rqh1 二重変異株のテロメア間の組換え中間体を蓄積することが示唆された。

B - 10 トリブチルスズ耐性に関与する分裂酵母 ABC トランスポーター遺伝子の同定

○秋山浩一¹, 櫻井康雄², 関藤孝之², 河田美幸¹, 柿沼喜己^{1,2}
(¹愛媛大総合科,²愛媛大農)

【目的】 トリブチルスズ (TBT) は難分解性で毒性が強く「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」の第二種特定化学物質に指定され船底の塗料などに使われてきたため環境汚染物質として利用が制限されている。TBT 化合物の毒性についての研究は主として動物細胞のアポトーシス誘導や貝類の雄化現象についてなされてきたが微生物に対する影響はほとんど調べられていない。そこで本研究では *Shizosaccharomyces pombe* を用いて TBT の影響を試験し TBT 耐性に関与する ABC トランスポーター遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】 *S. pombe* のゲノムデータベースから ABC トランスポーター遺伝子として同定されている 11 個の遺伝子をそれぞれ単独破壊した株と野生株について 1.5 μ M TBT を含む YES 寒天培地での生育を試験したところ *bfr1Δ* 株で顕著な生育阻害が観察された。次に野生株と *bfr1Δ* 株について YES 液体培地中で 30°C 30 分処理したときの生存率を試験した結果野生株及び *bfr1Δ* 株の LC50 はそれぞれ 25 μ M, 10.2 μ M であった。これらの結果及び出芽酵母で既に同定されている TBT の排出に関与する *pdr5* 遺伝子と *bfr1* 遺伝子の identity は 40.8%, homology は 80.1% であることから *bfr1* 遺伝子は TBT の排出に関与していると考えられた。野生株を抗酸化剤である N-アセチルシステインの共存下で同様の TBT 処理を行ったところ生存率の上昇が見られた。このことから TBT の毒性には活性酸素が関与していることが示唆された。

B – 11 Fungal metabolites for assessment of *Ganoderma boninense* pat. infection in oil palm

○ Roger Lieu Toh Choon, Sariah Meon, Siti Mariam
(University Putra Malaysia, Faculty of Agriculture)

Basal Stem Rot (BSR) caused by *Ganoderma boninense* is a serious disease in oil palm. Detection of BSR is based mainly on visible symptoms and confirmed by plating infected tissues on *Ganoderma* selective media. Unfortunately, these symptoms are only visible when at least half of the basal tissue has been infected. Current research on the plant-pathogen interaction showed that invasion by pathogens can lead to increase of fungal biomass in the healthy plant, making it detectable during the infection. Certain primary fungal metabolites were targeted as they were produced abundantly during the reproduction of mycelium. Therefore, the probable strategy is to unravel the metabolic pathway of the plant upon infection and possibly use this approach to distinguish healthy and infected palms at the early stage of infection.

This research focused on the potential of detecting targeted metabolites as indicators for *Ganoderma* infection in field palms. Based on the results obtained in this study, it could be concluded that *Ganoderma* infection in palms increase the production of metabolites which could be used as indicators for early detection of infection in oil palms. Further studies are needed to produce a better implementation of this finding as disease diagnostic tool in the commercialized oil palm field.

C - 1 母乳20検体中のビタミンB₆とピリドキシン-β-グルコシド含有量

○岩本沙耶¹, 古屋美知², Do Thi Viet Huong¹, 中山和子², 八木年晴¹
(¹高知大農, ²高知学園短期大)

母乳中ビタミン含有量の把握は乳児栄養の立場から重要である。アメリカ人女性の成熟乳中のピリドキサル (PL), ピリドキサミン (PM), ピリドキシン (PN) とそれらのリン酸エステル型 (PLP, PMP, PNP) の6種のビタミンB₆化合物とピリドキシン-β-グルコシド (PNG) の含有量は1987年までに4研究室で報告され、いずれにおいても最も相対量が高いのはPLであり、次いでPLPである。一方、日本人女性の成熟乳中のビタミンB₆化合物の分析結果は、2004年と2009年に分析され、PLPが主に存在すると報告された。今回BDHQにより食習慣調査をおこない、BMI等の情報を得た日本人女性から20検体の成熟乳を入手し、ビタミンB₆化合物とPNG含有量を4ピリドキシラクトン転換(酵素)HPLC法により分析した。

すべてのビタミンB₆化合物とPNGの回収率はおおよそ90%で、信頼性のある分析結果が得られた。20検体平均の総ビタミンB₆含有量は1.01 ± 0.32 nmol/mlであり、その内PLが70.3%を占め、次いで、PLPが15.8%であった。その他のビタミンB₆化合物の割合は数%であった。これらの結果は、日本人女性の成熟乳中の総ビタミンB₆含有量ならびにPLとPLPの相対量がアメリカ人女性成熟乳中とはほぼ同じであることを示した。BDHQで推定された各種の食品摂取量ならびに各種栄養素の摂取量と成熟乳中の各種ビタミンB₆化合物量、遊離型ビタミンB₆総量、リン酸型ビタミンB₆総量ならびにビタミンB₆総量の間に関連に関する知見を得た。

C - 2 筋萎縮抑制効果を示すプレニル化ケルセチンの生体利用性

○藤倉 温¹, 向井理恵¹, 河村知志², 室田佳恵子³, 根本尚夫², 寺尾純二¹
(¹徳島大栄養, ²徳島大薬, ³近畿大理工)

近年、プレニル化フラボノイドが高い生理活性を有することが報告されつつある。われわれは、ケルセチン (Q) にプレニル基を導入した8-プレニル化ケルセチン (PQ) を合成し、神経切除マウスを用いて経口摂取による廃用性筋萎縮抑制効果を比較した*。その結果、PQはQよりも強い効果を示す傾向がみられたが、プレニル化フラボノイドの生体利用性に関する報告はほとんどない。そこで本研究では、PQとQを用いて、プレニル基導入がフラボノイドの生体利用性に及ぼす影響を解明することを目的とした。ヒト小腸上皮モデル細胞Caco-2を用いた腸管吸収実験では、PQはQに比べて基底膜側への輸送量が少なかった。PQを強制経口投与したマウスの最高血中濃度はQの場合の約25%であり、in vivoにおいてもPQは腸管吸収率が低いことが示唆された。次に、0.2%のPQあるいはQを含む飼料を18日間摂取したマウスの腓腹筋中の蓄積量を比較した。その結果、PQの蓄積量はQよりもやや少ないものの、血漿濃度ほど大きな相違はないことが明らかになった。これらの結果から、PQはQに比べて血中から骨格筋への取り込み率が高いことが推定された。さらにマウス筋管細胞C2C12への取り込み実験において、PQはQより多く取り込まれるとともに排出されにくいことが明らかになった。以上の結果から、フラボノイドのプレニル化は腸管吸収効率を低下させるが、疎水性が高まるために血中から標的組織への移行蓄積性を向上させることが示唆された。

*Mukai et al. International Conference on Polyphenols and Health 2011 (Oct. 18th 2011)

C - 3 ケルセチン配糖体体内代謝物分子プローブの合成

○山口佑也, 齋木俊也, 村田芳行, 中村宜督
(岡山大院, 自然科学)

【目的】経口摂取されたケルセチン配糖体の多くは、腸内細菌叢により代謝を受けフェノール酸異化物へ変換されるが、その主要産物が3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) である。これまでに、DOPAC はラジカル消去作用や第二相解毒酵素誘導作用を示すことが報告されており、ケルセチン配糖体の生理機能を担う代謝物として注目されつつある。本研究では、DOPAC に親和性を示すタンパク質を同定することを目指し、生化学的に汎用性の高い Click Chemistry (Huisgen 環化反応) を利用した DOPAC 分子プローブを合成した。

【方法・結果】DOPAC とプロパルギルアルコールを用いた Fischer エステル化法により、末端にアルキン基を有する DOPAC プロパルギルエステル (DPE) を合成した。TLC により単離・精製を行い、¹H-NMR などの機器分析により、合成した化合物が DPE であると同定した。次に、合成した DPE とベンジルアジドを混合し、硫酸銅五水和物とアスコルビン酸ナトリウムの存在下で遮光して攪拌した。反応物を TLC で展開し、ドラーゲンドルフ試薬を用いた呈色反応に供した結果、橙黄色を示し、1,2,3-トリアゾール化合物を検出できたことから、Huisgen 環化反応の進行を確認した。合成して得られた DPE の求電子反応性及び生理活性については、現在検討中である。

C - 4 筋細胞を用いた脂肪酸代謝促進成分スクリーニング手法の開発

○阿部大吾, 齋藤 武, 野方洋一
(農研機構・近中四農研)

【目的】骨格筋は最大のエネルギー消費器官であり、骨格筋における脂肪酸代謝 (脂肪酸β酸化) を食品由来成分で調節できれば肥満由来の疾病を予防することが可能となる。しかし、脂肪酸β酸化の測定には [¹⁴C]-脂肪酸を用いた ¹⁴CO₂ トラップ法が多く用いられており、非常に煩雑なことからスクリーニング手法としては不適である。そこで本研究では、 [³H]-脂肪酸を用いた ³H₂O 測定手法を応用し、効率的な脂肪酸代謝促進成分スクリーニング手法を開発することを目的とした。

【方法・結果】実験には C₂C₁₂ 筋管細胞を用い、 [³H]-パルミチン酸を含むパルミチン酸含有 DMEM (2% BSA を含む) に目的化合物を添加し、一定時間培養した後に培養上清を回収し、トリクロロ酢酸を加えることでタンパクと共に未代謝の脂肪酸を沈殿除去した。上清は活性炭を分注した 96 ウェルガラス繊維フィルターに加え、遠心濾過することで測定阻害物質を除去した。濾過で得られた ³H₂O 液の pH を調整し、マイクロプレートシンチレーションカウンターで放射活性を測定した。ポジティブコントロールに PPAR δ のアゴニストである GW501516 を用いた結果、コントロールに比べ 20% 以上高い放射活性が得られた。以上より、構築したスクリーニング手法は筋細胞における脂肪酸代謝調節作用の評価アッセイとして使用できると考えられる。

C - 5 Immunoregulatory proprieties of *Echinacea purpurea* in murine splenocytes

○ Elliot RAKOTOMANANA¹, Tasuku OGITA², Kiminori MATSUBARA¹,
Takuya SUZUKI², and Soichi TANABE²

(¹Graduate School of Education and ²Graduate School of Biosphere Science,
Hiroshima University)

[Aims] *Echinacea* is well-known as one of the most popular herbal supplements because of its pharmacological activities by shortening the duration and severity of the symptom of upper respiratory infection. It was reported that *echinacea* can induce the secretion of different types of cytokine and alter the expression of key accessory molecules on immune cells. In this study, we examined, *in vitro*, the immunoregulatory proprieties of *echinacea* by using murine splenocytes stimulated with transforming growth factor- β and interleukin (IL)-6.

[Methods and Results] Water extract of root, leaf and stem of *Echinacea purpurea* was used at 1mg/ml. We found that the extract increased regulatory T cells significantly. The extract also drastically enhanced the expression of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) which was expressed mainly on regulatory T cells, CD11b⁺ (macrophages) and CD11c⁺ (dendritic) cells. CD11b⁺ and CD11c⁺ cells were also increased. Root and stem part were more effective than leaf. In addition, the extract induced the secretion of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 through cannabinoid 2 receptor and suppressed drastically the pro-inflammatory cytokine, IL-17, production. Taken together, these findings allow us to conclude that *Echinacea purpurea*, especially root and stem part, may regulate immune responses.

C - 6 エチレン共重合体系ポリマーコートしたリモネン・ β -シクロデキストリン包接体の噴霧乾燥粉末の作製

○山本智昭^{1, 2}, Tze Loon Neoh², 本坊洋一², 木村伸一¹, 吉井英文²
(¹鳥取産技セ, ²香川大農)

【目的】環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) は、様々な化合物と包接化合物を形成し、熱や酸化などの外的環境から保護機能、湿度に応答して徐放する性質がある。しかし、シクロデキストリン (CD) は、大量の水に接触するような工程を伴う製品には適していない。徐放性を損なわず、シクロデキストリン包接体に耐水性を付与することができれば、様々な製品への応用が可能である。

本研究では、噴霧乾燥法により、香料 *d*-リモネンを包接した β -CD をエチレン共重合体でコーティングした粉末を作製し、噴霧乾燥条件 (樹脂の違いや濃度) による、粉末の形状、粒径、フレーバーの保持率について検討した。

【方法・結果】*d*-リモネンと β -シクロデキストリン (β -CD) の包接体溶液に種々のエチレン共重合体系ポリマー (ポリマーコート剤) を添加し、噴霧乾燥機を用いてポリマーコートした噴霧乾燥粉末を作製した。噴霧乾燥粉末の平均粒径、微細構造、粉末中のリモネン量の特性に対する、ポリマーコート剤の材質および添加量の影響を評価した。噴霧乾燥粉末の平均粒径および微細構造は、ポリマーコート剤の添加量の増加に伴い、平均粒径も増加し、微細構造も破片状から球構造を形成し、平均粒径約 80 μm の粉体が得られた。平均粒径や微細構造について、ポリマーコート剤の材質は大きく影響しなかったが、噴霧乾燥粉末の水分散後の形状維持性についてポリマーコート剤の材質が大きく影響した。

C - 7 魚肉タンパク質の加熱ゲル化に及ぼす D-プシコースの影響

○井上雅貴, 小川雅廣, 早川 茂
(香川大院・農研科)

【目的】希少糖 D-プシコース (Psi) はノンカロリーの単糖であり, カスタードプリンなどの加工食品に添加することで破断強度や粘弾性などが向上する。魚肉すり身に Psi を添加してカマボコを作製すると, 従来の糖 (スクロース (Suc), D-ソルビトール (Sor)) 添加のものとは比べてゲル強度が高くなることを前回報告した (第 28 回講演会)。そこで本研究では, Psi が魚肉タンパク質の加熱ゲル化に及ぼす影響を調べることを目的とした。

【方法・結果】マダイ肉からアクトミオシン (AM) を調製した。3mg/ml AM に 5% の糖 (Suc, Sor, グルコース (Glc), Psi) を添加し, 各温度 (30 ~ 90℃) で 30 分間加熱した。熱処理した AM の SH 基量を DTNB 法で測定したところ, 90℃ 加熱した Psi 添加 AM の SH 基量は, 他の糖添加のものとは比べて 40 ~ 60% 低かった。熱処理した AM の遊離アミノ基量を OPA 法で測定したところ, Psi 添加 AM と他の糖添加 AM との間で大きな差は見られなかった。5% 糖添加した AM 溶液 (30mg/ml) の熱安定性を示差走査熱量計で測定したところ, Psi 添加 AM の熱変性温度は, 他の糖添加のものと同様に 2 ~ 3℃ ほど上昇した。これらの結果から, Psi 添加による魚肉すり身のゲル強度の向上には SH 基量の減少が関与していると考えられた。

C - 8 魚介類由来グリコサミノグリカンの含有量調査と組成分析

○有馬和也¹, 藤田裕之¹, 今津綾夏¹, 堤下 - 中井奈緒¹, 武田尚子¹,
中尾康裕¹, 松下健也¹, 川野愛美¹, 田中晴奈¹, 中村 歩¹, 森本 慎¹,
王 恵¹, 八東龍也¹, 稗田優香¹, 北垣雅広¹, 林 宏樹¹, 奥原隆司¹,
湯村 健¹, 渡辺彩子¹, 中山 清², 石原幸雄³, 増田紳哉³, 吉岡俊介⁴,
吉岡 忍⁴, 白出征三⁵, 田村純一¹
(¹鳥取大地域・地域環境, ²カンダ技工, ³鳥取水試, ⁴オーク, ⁵白謙蒲鉾)

【目的】コンドロイチン硫酸 (CS) やヒアルロン酸 (HA) は, 医薬品, 健康食品, サプリメントとして注目されており, たいへん需要が高い。現在利用されている資源生物は主にサメやブタである。これらは捕獲制限や感染症の危険が問題となっており, 代替資源生物の探索が焦眉の課題となっている。CS や HA は動物に広く存在しているが, 生物やその部位により組成や含有量が異なる。今回, 代替資源生物の探索を目的として, いくつかの魚介類について CS, HA およびデルマタン硫酸 (DS) の含有量調査と組成分析を行った。

【方法と結果】いくつかの魚介類を部位別に粉碎し, アセトンなどの有機溶媒による脱脂・乾燥後, プロテアーゼによるタンパク分解を行い, 透析後イオン交換樹脂により精製し, 透析とゲル濾過によってさらに精製した。これらの精製糖鎖を, コンドロイチナーゼ ABC などの種類の異なる特異的糖鎖分解酵素により消化し, 得られる不飽和二糖を HPLC (PA-03 カラム) で分析した。その結果, 今回用いた魚介類の部位には, 含有量や組成が異なるが, CS, DS, HA の存在を確認できた。

C - 9 キサンテン系食用色素と血清アルブミンの機能的相互作用

○進 裕子, 高野 大, Qi Hang, 村田芳行, 中村宣督
(岡山大院・自然科学)

【目的】我々はこれまでに、キサンテン系食用色素である phloxine B (PhB) が、光照射条件下において過酸化水素を産生し、ヒト前骨髄性白血病由来 HL-60 細胞にアポトーシスを誘導することを報告してきた。本研究では、他のキサンテン系食用色素 (erythrosine B, ErB; rose bengal, RB) にも PhB と同様の機能特性が認められるか否かを評価するだけでなく、光細胞毒性作用に影響を与える因子としてウシ血清アルブミン (BSA) に着目し、各食用色素との機能的相互作用について検討した。

【方法・結果】過酸化水素量の測定は FOX assay により、HL-60 細胞の生存率測定はトリパンブルー染色排除法にて行った。また、タンパク質酸化の評価は、DNTP 法によりタンパク質カルボニルを定量することで行った。ErB 及び RB は、PhB と同様に、濃度依存的な過酸化水素産生と細胞死を誘導した。その一方で、BSA の共存により、PhB が誘導する過酸化水素産生量、細胞毒性が有意に減少したのに対し、ErB では顕著な変化が認められなかった。BSA の酸化は PhB で低値であったが、その他の色素では有意な増加が認められた。以上の結果から、PhB の光増感作用は BSA との相互作用により顕著に減弱すること、またタンパク質との相互作用において各色素で異なる挙動を示すことが示唆された。

C - 10 生もと酒母における苦味ペプチドの動向

○伊藤一成, 福崎智司, 産本弘之, 三宅剛史
(岡山県工技セ)

【目的】一般に、生もと造りによる製成酒は速醸もとによる製成酒よりもペプチドが高蓄積することが示され、官能的な特徴に寄与していることが示唆されている。最近、日本酒に含まれる 6-13 鎖の苦味ペプチドが同定された。生もとと速醸もとの酒母におけるペプチドの動向の違いについては定量的に解明されたものの、その時に生成・分解するペプチドの種類ならびに経時変化について明らかになっていない。本研究では、酒母における苦味ペプチドの動向を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】精米歩合 60% の α 米と乾燥麴を用い、総米 200g の小仕込みを行った。生もとでは仕込み時に亜硝酸と酒造会社の生もと酒母から分離同定した乳酸菌を加え 13 日目に酵母培養液を添加した。速醸もとは仕込み時に乳酸と酵母培養液を添加し行った。温度管理は恒温槽で行い、それぞれの小仕込みから経時的に採取し遠心分離した上清を分析試料とした。分析の結果、生もとでは苦味ペプチドを含む全オリゴペプチドが速やかに減少するのに対し、速醸もとは多くの苦味ペプチドが残存することを見いだした。こうしたペプチド成分の動向において酵母は関与しておらず、完成時の苦味ペプチド含量が麴歩合による顕著な影響をうけたことから、麴由来の酵素による苦味ペプチドの分解様式が生もとと速醸もとの異なっていると思われる。

C - 11 トチノキ種皮、ブルーベリーおよびクランベリー由来のプロアントシアニジンのチオリシスによる構造分析

○小川智史¹、木村英人¹、秋廣高志²、横田一成^{2,3}
(¹寿製菓, ²鳥根大生物資, ³鳥取大院連農)

【目的】 Proanthocyanidin (PA) は、抗酸化作用や抗肥満作用など様々な機能性を示すことが知られているが、それらの構造分析には多くの課題がある。これらの解析には、PA をベンジルメルカプタンなどの求核試薬を酸性下で分解して重合体の構成成分を解析するチオリシスによる分析が行われる。チオリシスでは、PA の末端ユニットと、伸長ユニットのモル比から重合度の推定が可能であるが、重合度が上がるほど、伸長ユニットに比べ末端ユニットの収量が少なくなり分析が困難になる。今回、これらの欠点を改善したチオリシスの分析条件を検討した。

【方法・結果】 トチノキ種皮、ブルーベリー、クランベリーより、高度重合性のPAを精製した。チオリシスの求核試薬としてドデカンチオールを選定した。末端ユニットおよび伸長ユニットの構造分析を行った結果、末端ユニットの構成成分として、トチノキ種皮とクランベリーで、catechin, epicatechin, procyanidin A2が検出されたが、ブルーベリーでは、catechin, epicatechinのみが確認された。一方、伸長ユニットを分析すると、トチノキ種皮は、(epi)catechin, (epi)gallocatechinを含む二重結合性のAタイプの結合を有する二量体と三量体が確認された。クランベリーでは、トチノキ種皮と構成成分は類似していたがAタイプの結合をもつ三量体は確認されなかった。ブルーベリーでは、ほとんどが、Bタイプの単結合が切れた単量体の(epi)catechinであったが、(epi)gallocatechinの存在も確認された。

C - 12 鳥取県大山産ブルーベリーリーフ熱水抽出物の血糖値上昇抑制効果

○山田卓弘¹、橋本恵利¹、薮田行哲¹、川端雄勇²、渡辺文雄¹
(¹鳥取大学農, ²株式会社かわばた)

【目的】 鳥取県大山産ブルーベリーリーフの有効活用を目指して、ハイブッシュ系及びラビットアイ系の各種ブルーベリーリーフに機能性因子が存在するかどうかを検討した結果、ラビットアイ系コースタルで最も高い総ポリフェノール含量を示した。また、コースタル乾燥葉の熱水抽出液において血糖上昇抑制効果が期待される α -アミラーゼ阻害活性ならびに α -グリコシダーゼ阻害活性が検出されたことから、本乾燥葉は「食後の糖の吸収をおだやかにする」効用を付加した機能性食品素材として活用できる可能性が示唆された。そこで、コースタル乾燥葉から調製したお茶と数種の市販のブルーベリー茶の有効成分（総ポリフェノール量）ならびに α -グリコシダーゼ阻害活性を測定すると共に、ラットを用いた糖負荷試験により血糖値上昇抑制効果を検証した。

【方法・結果】 総ポリフェノール量はフォリン・チオカルト法を用いて、また α -グリコシダーゼ阻害活性はラット小腸由来 α -グリコシダーゼを用いてマルトースから生成するグルコースをD-グルコース測定キット（ヘキソキナーゼ法）で定量した。その結果、コースタル乾燥葉を用いたお茶で両者とも最も高い数値（総ポリフェノール 153 mg /150 mL； α -グリコシダーゼ阻害活性 26%）を示した。ウイスター系オスラット（8週齢）に胃ゾンデを用いてマルトース（0.25 g/mL）1 mLを強制投与後、直ちにコースタル乾燥葉茶（熱水抽出液、総ポリフェノール 10 mg含有）1 mLを連続投与した結果、投与後、30-60分において血糖値ならびに血清インスリン濃度の上昇を有意に抑制した。

D - 1 宇宙環境で生育するミズナの遺伝子発現解析

○金森太治郎¹, Gusev, O.², Bingham, G.³, Levinskikh, M.⁴, Sychev, V.⁴,
Hummerick, M.⁵, Wheeler, R.⁵, 今野晴義¹, 杉本 学¹
(¹ 岡山大・植物研, ² NIAS, ³ ユタ州立大・SDL, ⁴ IBMP・RAS, ⁵ NASA・KSC)

【目的】宇宙空間で長期間にわたり栽培した植物における生育や遺伝子発現に関する報告は少ないが、宇宙放射線の影響による酸化ストレス、微小重力の影響による細胞壁構造の変化等が起きる事が予測されている。本研究では、宇宙環境における植物のストレスや応答反応を明らかにする目的で、国際宇宙ステーション (ISS) に設置されている植物栽培装置を用いてミズナを栽培し、ストレス応答・防御遺伝子および細胞壁代謝系遺伝子の発現を検討した。

【方法・結果】ミズナ種子を ISS ロシアモジュール内に設置している植物栽培装置「LADA」のルートユニットにセットし、日照 24 時間、気温 25℃、湿度 70% の条件下で栽培を行った。栽培 27 日目に収穫したミズナは直ちに超低温庫で保存し地上に搬送した。地上にある LADA で気温、湿度、給水量等 ISS 中での栽培条件と同じにして栽培したものを対照とした。葉 total RNA から作製した cRNA を Agilent 社 Arabidopsis OligoMicroarray (4 x 44K) を用いて解析した結果、宇宙栽培ミズナで発現量が対照の 2 倍以上である遺伝子が 2193 種、1/2 以下である遺伝子が 439 種認められた。Real-Time PCR 法により遺伝子の発現量を検討した結果、ストレス応答・防御遺伝子では HSP17, HSP18, HSP90, PR-1a, CAT, PAL が増加し、細胞壁代謝系遺伝子では α -arabinofuranosidase, α -galactosidase, β -1,3-glucanase, β -1,3, 1,4-glucanase, β -galactosidase が減少していた。

D - 2 ストレス応答における葉緑体由来の H₂O₂ シグナリングの生理機能

○丸田隆典¹, 芦田奈々¹, 野志昌広², 薮田行哲³,
吉村和也⁴, 澤 嘉弘¹, 石川孝博¹, 重岡 成²
(¹ 鳥根大・生資科・生命工, ² 近畿大・農・バイオ, ³ 鳥取大農, 生資環,
⁴ 中部大応生・食栄)

葉緑体は植物細胞内における主要な活性酸素種 (ROS) の生成部位であるため、酸化シグナリングの発信源であると考えられる。これまでに我々は、葉緑体で生成された H₂O₂ を介した酸化的シグナリングの生理作用を明らかにするために、チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (tAPX) 発現の誘導抑制系を構築してきた。tAPX 誘導抑制系を用いたマイクロアレイ解析により、葉緑体由来の H₂O₂ は低温ストレスや病原菌応答に関与する可能性が示唆された。そこで本研究では、葉緑体由来の H₂O₂ のストレス耐性/応答に及ぼす影響を解析した。

tAPX の誘導抑制により、低温ストレスシグナリングに関与するいくつかの転写因子の発現が抑制された。また、tAPX 発現を抑制させた植物は低温ストレスに高感受性を示した。さらに、tAPX の誘導抑制により、耐病性ホルモンであるサリチル酸の増加とともに、病原菌応答性遺伝子群の誘導が認められた。よって、葉緑体由来の酸化的シグナリングは非生物学的ストレス応答だけでなく、サリチル酸依存的な生物学的ストレス応答にも関与することが示唆された。現在、葉緑体由来の H₂O₂ シグナリングに関与する転写因子の機能解析を試みている。

D - 3 植物ホルモン・オーキシンの光による投与制御

林 謙一郎, 山崎壮真, 野崎 浩
(岡山理科大学・生物化学)

植物ホルモンであるオーキシンは、植物体内でオーキシン輸送体により極性輸送される。その結果生じるオーキシンの濃度勾配は、植物の成長制御に極めて重要である。すなわち、オーキシンの濃度勾配の調節による分化・成長調節機構を詳細に解析するには、人為的にオーキシンを正確に投与することが望まれている。オーキシンを含むゲル・ワックス剤などを部分的に接触させて行うこれまでの投与方法では、時間的、空間的な精度に限界がある。

我々は光照射によりオーキシンを遊離するケージドオーキシンを分子設計し、光照射によってオーキシンの投与を極めて精密に制御できると考え、ケージドオーキシンの設計と合成を試みた。植物細胞では、動物細胞とは異なり、エステラーゼ活性が高く、オーキシンのカルボキシル基をエステル化したケージドオーキシンを設計・合成したが、それらは、植物体内でエステラーゼによる加水分解を受け、光照射と無関係にオーキシンの遊離が確認された。そこで、エステラーゼに抵抗性のケージド基である、4-methoxy nitroindoline 基を用いて、オーキシンのカルボキシル基を3級アミド結合でケージド化した。今回、その MNI 基を用いてケージド化したオーキシン (MNI-ケージドオーキシン) について報告する。

D - 4 フコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 株由来フコイダン低分子化酵素の特性

¹大城 隆, ¹小林泰明, ¹原田尚美, ²三木康成, ²川本仁志
(¹鳥取大工, ²海産物のきむらや)

【目的】褐藻の表面のヌメリ中にはフコイダンと総称される主にフコースと硫酸化フコースが α 1-2又は、 α 1-3結合した多糖が存在している。この多糖は1913年に発見されてから現在までに抗ガン作用などの様々な生理活性が報告されているが、その生理活性と構造との関係は完全には解明されていない。そこで、フコイダンを酵素的に処理することで、ある種の構造のフコイダンを取得し、生理活性と構造の関係を明らかにすることを最終目的として、今回当研究室で単離したフコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 株のフコイダン分解に関する酵素系の特性解明を試みた。

【操作・結果】フコイダンを単一炭素源とする培地で培養した *Luteolibacter algae* H18 株から無細胞抽出液を調製し、その後 DEAE-Sepharose による精製を行った。精製の結果得られた画分を単一で酵素として用いた場合、フコイダン低分子化活性は著しく低下したが、複数の画分を同時に酵素として用いた場合に低分子化活性の向上が確認された。以上のことから H18 株にはフコイダンを低分子化するための酵素が複数存在し、これらを同時に作用させた場合に顕著にフコイダンの低分子化を確認することができた。また、酵素的なフコイダン分解が進行する際、フコイダンに作用する順序もあることが示唆された。

D - 5 スーパーフォルダー GFP 発現系の構築と機能解析

○森 祐磨, 田村 隆, 稲垣賢二
(岡山大院・自然科学)

【目的】 GFP はオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質であり, 青紫色の光を吸収し, 緑色光を発光することで知られている。GFP は, 生体内で融合タンパク質として発現させることで, 標的タンパク質の分布や動態の観察に役立っている。現在, GFP について, 最も構造安定性が高く, 自己フォールディング能力の高いスーパーフォルダー GFP が報告されている。本研究では, 高度好熱菌における GFP 発現を目的として, まず大腸菌におけるスーパーフォルダー GFP 発現系構築を行い, 発現させたスーパーフォルダー GFP の熱安定性, リフォールディング速度について解析した。

【方法】 部位特異的変異導入とライゲーションにより GFP 発現用ベクター (pGLO) の GFP 遺伝子に 6 つの変異 (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V, A206V) を導入した。さらに, GFP 遺伝子の C 末端に His-tag を連結し, Ni-NTA カラムを用いてスーパーフォルダー GFP と野生型 GFP をそれぞれ精製した。精製した各 GFP を用いて, 熱安定性とリフォールディング速度を比較した。

【結果】 スーパーフォルダー GFP は野生型 GFP と比較して熱安定性, リフォールディング初速度の向上が確認できた。熱安定性測定の結果, スーパーフォルダー GFP は 70℃ においても約 90% の蛍光を維持していたことから, 高度好熱菌における発現が期待できる。

D - 6 放線菌 *Rhodococcus opacus* NBRC 100624 株由来低基質特異性 L-アミノ酸オキシダーゼの性質検討

○新屋敷健悟, 日下部 均¹, 田村 隆, 稲垣賢二
(岡山大院・自然科学, ¹ (株) エンザイムセンサ)

【目的】 L-アミノ酸オキシダーゼ (以下 LAO) は, L-アミノ酸の酸化的脱アミノ化反応を触媒する酵素で, 蛇毒を始め, 様々な生物において報告されている。その多くが L-アミノ酸を幅広く基質とする¹⁾。一方で, L-グルタミン酸オキシダーゼ²⁾や L-リシンオキシダーゼなどの高基質特異性 LAO も存在し, 本研究室ではそれらの構造解析を行っている。本研究では LAO の基質認識機構及び酵素進化の全容解明を目的として, *Rhodococcus opacus* NBRC100624 株由来 LAO の性質検討を行った。

【方法】 *R. opacus* NBRC100624 株の培養には M65 培地を用い, 超音波処理による菌体破碎を行った。活性測定は, LAO の反応で生産される α -ケト酸を MBTH 法により定量した。

【結果及び考察】 *R. opacus* NBRC100624 株から LAO を抽出及び精製を行った。20 種類の L-アミノ酸を用いて, 基質特異性の検討を行った結果, L-グリシンと L-プロリンにおいて活性が検出されず, その他の 18 種類の L-アミノ酸では活性が検出された。本酵素は, ガラガラヘビを初めとする蛇毒由来 LAO と比べても, 更に低基質特異性であることが判明した。

参考文献:

- 1) Naumann GB., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1810**, 683-694(2011)
- 2) Utsumi T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2011) in press.

D - 7 *Pseudomonas* 由来ファミリー S58 アミノペプチダーゼの酵素化学的性質

○田中あゆみ, 森本正純, 森 信寛, 有馬二郎
(鳥取大農)

【目的】我々は、セリンペプチダーゼが持つアミノリシス活性に着目し、その機能を利用したペプチド合成を試みている。今回新たに、*Pseudomonas aeruginosa* の S58 ファミリーに属するペプチダーゼを取得し、高いアミノリシス活性を確認した。本発表では、本酵素のアミノリシス活性に焦点を当てた諸性質と、活性中心の変異によるアミノリシス活性への影響について報告する。

【方法と結果】大腸菌で発現させた組換え酵素を、数段階の精製過程を経て部分精製品を得た。諸性質を検討した結果、本酵素の熱安定性は 50℃、pH に対しては 6.0 ~ 9.8 の間で安定であり、 β -Ala, D-Ala, Gly-pNA に対し加水分解活性を示した。また加水分解における最適 pH は 6.0 であったが、アミノリシスの最適 pH は 8.0 であり、両活性との間でその性質は大きく異なった。次に活性中心である Ser247 を Cys に置換し、変異酵素 (S247C) を構築した。S247C の部分精製標品を調整し、その性質を野生型酵素と比較したところ、安定性は野生型酵素と殆ど変わらなかったが、加水分解活性は殆ど失われた。一方で、アミノリシス活性は β -Ala-pNA を基質にした時に高い活性が確認され、その最適 pH は 9.8 であった。また、アミノリシスにおける基質特異性は野生型と S247C の間で大きく異なり、野生型は D-Pro-OBzl をアシル供与体として反応させた時、いくつかのアミノ酸-pNA がアシル受容体として利用可能であった。一方で、S247C は D-Pro-OBzl に対し殆ど反応性を示さなかったが、 β -Ala-pNA をアシル供与体として反応させた時、Leu-pNA や Gly-pNA を効率よくアシル受容体として利用した。

D - 8 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口へのアブシジン酸の役割

○叶 文秀¹, Mohammad Anowar Hossain¹, 中村宜督¹, 森 泉², 村田芳行¹
(¹岡山大院自然, ²岡山大植物研)

我々は、ジャスモン酸メチル (MeJA) 誘導気孔閉口にアブシジン酸 (ABA) が必要であることを明らかにした。しかし、その機構については十分に明らかにされていない。本研究では、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ABA 生合成変異体 *aba2-2* を用いて、MeJA が誘導する活性酸素種 (ROS) と一酸化窒素 (NO) の産生ならびに細胞質アルカリ化を調べた。*aba2-2* では、MeJA が誘導する ROS と NO の産生が抑制されたが、気孔閉口を誘導しない低濃度の ABA で前処理した場合、野生株と同様の ROS と NO の産生が見られた。一方、MeJA が誘導する細胞質アルカリ化は、野生型と *aba2-2* の両方で観察された。内生 ABA は、MeJA シグナル伝達経路において、ROS と NO の産生の上流で働き、細胞質アルカリ化には関与しないことが示された。

D – 9 Methylglyoxal induces stomatal closure accompanied by peroxidase-mediated ROS production in *Arabidopsis*

○ Tahsina Sharmin Hoque, Misugi Uraji, Wenxiu Ye, Yoshimasa Nakamura,
Yoshiyuki Murata
(Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

Methylglyoxal (MG) is a reactive aldehyde and a glycolytic intermediate that accumulates in plants under environmental stresses. Due to high reactivity, aldehydes are believed to act as toxic molecules at high concentrations and as signaling molecules at low concentrations. The effects of MG in microorganisms and animals have been well studied but the effects of MG in higher plants still remain to be elucidated. In this study, to clarify the functions of MG in plants, we analyzed stomatal response to exogenous MG in *Arabidopsis*. MG induced production of reactive oxygen species (ROS) and elevation of cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$) leading to stomatal closure in wild type and an NAD(P)H oxidase mutant, *atrbohD atrbohF*. MG-induced stomatal closure, ROS production, and $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation were significantly inhibited by a peroxidase inhibitor, salicylhydroxamic acid (SHAM). These results suggest that MG which accumulates under stress conditions induces stomatal closure accompanied by extracellular ROS production mediated by SHAM-sensitive peroxidases, intracellular ROS accumulation, and $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation.

D – 10 Positive regulation of SA signaling by MAP kinases, MPK9 and MPK12, in *Arabidopsis* guard cells

Mohammad Abdus Salam¹, Fabien Jammes², Mohammad Anowar Hossain¹,
Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C.Mori³, June M. Kwak², Yoshiyuki Murata¹
(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²Dept. Cell Biol. & Mol. Genet., Univ.
Maryland, ³IPSR, Okayama Univ.)

We previously reported that two mitogen-activated protein kinases (MAPKs), MPK9 and MPK12, positively regulate abscisic acid (ABA)- and methyl jasmonate (MeJA)-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Salicylic acid (SA) induced stomatal closure accompanied by extracellular reactive oxygen species (ROS) production, intracellular ROS accumulation, and cytosolic alkalization but not by cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$) oscillation. In this study, we examined whether these two MAP kinases are involved in SA-induced stomatal closure using an MAPKK inhibitor, PD98059, and MAPK mutants, *mpk9*, *mpk12*, and *mpk9 mpk12* mutants. PD98059 inhibited SA-induced stomatal closure. SA induced stomatal closure in the *mpk9* mutant and the *mpk12* mutant but not in the *mpk9 mpk12* mutant. However, SA induced extracellular reactive oxygen species (ROS) production, intracellular ROS accumulation, and cytosolic alkalization in the *mpk9*, *mpk12*, and *mpk9 mpk12* mutants. SA did not induce $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillation in either the wild type or the *mpk9 mpk12* mutant. These results suggest that MPK9 and MPK12 positively and Ca^{2+} -independently function in SA signaling.

D - 11 Roles of myrosinases in stomatal movement in *Arabidopsis*

Mohammad Shakhawat Hossain¹, Mohammad Mahbub Islam¹, Misugi Uraji¹,
Eiji Okuma¹, Yoshimasa Nakamura¹, Izumi C. Mori², Yoshiyuki Murata¹
(¹Div. of Biosci., Okayama Univ., ²IPSR, Okayama Univ.)

Myrosinase is an enzyme that catalyzes hydrolysis of glucosinolates to form toxic compounds as isothiocyanates (ITCs), nitriles, and thiocyanates and serves to protect plant against insects, herbivores, and pathogens. Six thioglucoside glucohydrolase (*TGG*) genes are identified on *Arabidopsis* genome and *TGG1* and *TGG2* are abundantly expressed in *Arabidopsis* guard cells. The *tgg1* mutation impaired inhibition of light-induced stomatal opening by ABA and the *tgg1 tgg2* mutation impaired ABA- and MeJA-induced stomatal closure. Recently, we reported that allyl isothiocyanate (AITC) induced stomatal closure. To clarify the roles of myrosinases in guard cells, we investigated stomatal responses to AITC in the *tgg1-3*, *tgg2-1*, and *tgg1-3 tgg2-1* mutants. AITC induced stomatal closure in wild type and the *tgg1-3* and *tgg2-1* mutants but not in the *tgg1-3 tgg2-1* mutant. AITC-induced production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and cytosolic alkalization in guard cells were observed in wild type and all these *tgg* plants. These results suggest that myrosinases, *TGG1* and *TGG2*, function as positive regulators in ABA, MeJA, and AITC signaling and that degradation of glucosinolates mediated by myrosinases is not involved in ABA signaling and MeJA signaling.

D - 12 シロイヌナズナ *vtc2* 変異体におけるアスコルビン酸取込み能の評価

○山本 遥, 孝田 翔, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博
(島根大・生資科・生命工)

植物はD-マンノース /L-ガラクトース (D-Man/L-Gal) 経路によりアスコルビン酸 (AsA) を生合成している。シロイヌナズナにはこれまでに、5種類のAsA欠乏変異体 (*vtc1-vtc5*) が存在し、未同定の *vtc3* を除きいずれも D-Man/L-Gal 経路構成酵素の変異体である。*VTC2* 遺伝子は D-Man/L-Gal 経路上の GDP-L-Gal フォスホリラーゼをコードしており、3種類の *vtc2* 変異体アレルのうち特に *vtc2.1* は第5イントロンの3' スプライス部位変異による機能喪失変異体で、葉中AsA量は野生株の約20%と *vtc* 変異体の中で最も少ない。また、非光化学消光 (NPQ) 値が野生株より低いことから、葉緑体中AsAレベルも低いと考えられている。本研究では、*vtc2* 変異体の葉緑体におけるAsA取込み能について、NPQとAsAの還元性を利用した銀染色法により評価を行った。播種後4週間の *vtc2.1* 成熟葉に対し、100 mmol/m²/sの連続光照射下10 mMのNa AsAを与え、経時的に葉中AsA量を測定した結果、12時間までに約2倍に増加した。この時AsAの取込み速度は野生株と有意な違いは認められなかった。AsA取込み後の *vtc2.1* 葉のNPQを測定した結果、野生株とほぼ同等の値に回復が認められ、銀染色によりプラスチドでの銀沈着が観察されたことから、*vtc2.1* の葉肉細胞および葉緑体におけるAsA取込み能は野生株と同程度であることが示唆された。

E - 1 酢酸菌膜結合型ヘテロ 3 量体フラボプロテイン・ソルビトール脱水素酵素における小サブユニット SldS の役割

○薬師寿治¹, 有常真由美¹, Wichai Soemphol², 外山博英³, 松下一信¹
(¹山口大農, ²コンケン大学, ³琉球大農)

【はじめに】 ビタミン C 生産の要であるソルビトールからのソルボース発酵は, 酢酸菌の酸化能力を利用する好例の一つである。ソルボース生産にはピロロキノリンキノン (PQQ) に依存する膜結合型グリセロール脱水素酵素が主に働くが, FAD 依存の膜結合型ヘテロ 3 量体のソルビトール脱水素酵素 (SLDH) によっても行われる。細胞の外側で機能する SLDH は, フラボプロテイン脱水素酵素である SldL, チトクロム *c* の SldC, 小サブユニット SldS から構成される。Yamaoka らは *Burkholderia cepacia* 由来の膜結合型ヘテロ 3 量体フラボプロテイン酵素・グルコース脱水素酵素 (BcGDH) を用い, SldS が SldL の安定化と輸送の両方の役割を持つことを示した。また, SldS のシグナル配列を欠いただけの変異体でも SldL がきちんと形成されなかったため, SldS のシグナル配列もフォールディングに関わることを示唆する。

【結果と考察】 *Gluconobacter frateurii* THD32 株から *sldSLC* 遺伝子をクローニングし, SldSL のみを大腸菌で発現させた。この大腸菌は SLDH 活性を持っていた。次に, SldL のみ, SldL に SldS のシグナル配列を融合させた変異体 SldL のみ, シグナル配列を欠いた SldS と野生型 SldL (Δ SS-SldS/SldL), これらを発現する 3 種のプラスミドを構築した。大腸菌での発現を試みたところ, Δ SS-SldS/SldL のみが活性を示した。すなわち, BcGDH とは異なり, 輸送を伴わないで機能を持った SldSL を発現させることに成功した。この結果は, SldS と SldL が細胞内でのフォールディングの完成を経て細胞の外側に輸送されるという分子構築過程を支持する。

E - 2 牛乳ラクトパーオキシダーゼの細菌リポポリサッカライドとの結合性について

○西本尚史, 早川 茂, 小川雅廣
(香川大農)

【目的】 ラクトパーオキシダーゼ (LPO) は H_2O_2 を分解し, 生じた活性酸素と SCN^- により抗菌作用を有する OSCN⁻ を産生し, グラム陰性菌の生育を抑制する。LPO が効果的に働く機構として細菌に対する親和性が考えられる。その点を明らかにするために, グラム陰性菌の細胞壁表層部のリポポリサッカライド (LPS) と LPO の結合性について検討を行った。

【方法・結果】 リゾチームは LPS 存在下においては溶菌活性が阻害される。LPO を加えることにより, この阻害が緩和されるかどうかについて調べた。溶菌活性は, *Micrococcus luteus* を基質として 700nm における濁度の減少により求めた。リゾチームの溶菌活性は LPS 存在下で 50% ほどに低下するが, LPS と同量の LPO を加えることによりほぼ元の活性に戻ることが分かった。加熱変性や還元処理したリゾチームは *Salmonella enteritidis* (SE) に対し高い抗菌活性を有する。この抗菌活性に対し LPO が共存するとどのように影響するか検討した。リゾチームを SE に加えて一定時間保持し, 寒天培地上のコロニー数から抗菌活性値を算出した。加熱変性あるいは還元処理リゾチームの抗菌活性は LPO を加えることにより低下した。以上の結果より, LPO は LPS と結合することにより, リゾチームの溶菌活性を回復させること, また, LPO は SE の表面の LPS を被覆してリゾチームの攻撃を抑えることが考えられ, LPO が LPS に結合することにより溶菌活性, 抗菌活性に影響を及ぼすと考えられた。

E - 3 細胞内導入型転写因子と両親媒性ペプチドの併用による機能発現の向上

○榎原将紘, 山口慎二, 近藤信次, 山田秀徳, 二見淳一郎
(岡山大工)

変性状態のタンパク質の Cys 残基に可逆的な SS 結合を介して正電荷を付加する可逆的変性カチオン化法は, 変性タンパク質の可溶化と生細胞内導入に優れた技術である。特に, 不安定な物性の細胞内タンパク質は, 本手法により高純度かつ水溶性として取得できるほか, 凍結乾燥品として安定に保存することも可能である。この可逆的変性カチオン化タンパク質は生細胞の培養上清に添加すると, 細胞表面への静電的な吸着を介して細胞内に移行し, 還元的な細胞質内でカチオン化試薬が還元・解離し, 自発的またはシャペロン依存的に活性構造に folding することが可能である (in cell folding 法)。我々はこのシステムを活用し, 細胞機能を制御しうる転写因子タンパク質を細胞内導入型とし, 新規なツールとして開発を進めている。本発表では, TAPS-Sulfonate を用いた可逆的変性カチオン化法による高純度精製までの, ならびに転写因子タンパク質を中心とした細胞内導入と機能発現について一連のスキームについて紹介する。さらに, 細胞表面への吸着を介したエンドサイトーシス様の経路でのタンパク質の細胞内導入では, エンドソーム中のタンパク質を効率的に細胞質まで移行させることが重要である。種々の検討の結果, 両親媒性ペプチドの併用によりエンドソームから細胞質への移行効率が向上し, 細胞内導入型転写因子の機能発現レベルを大幅に向上させることに成功した。また, 本システムの活用例についてもご紹介したい。

E - 4 **Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase, the first enzyme in degradation pathway I for pyridoxine.**

○ Mugo Andrew N.,¹ Kobayashi Jun,² Mikami Bunzou,² Ohnishi Kouhei,³ Yagi Toshiharu¹
(1 高知大農, 2 京大院農, 3 高知大遺伝子実セ)

[Aims] To elucidate the tertiary structure of pyridoxine 4-oxidase (PNox; EC 1.1.3.12). PNox, an FAD-dependent enzyme, is the first step enzyme in the degradation pathway I for pyridoxine, which was found in a nitrogen-fixing symbiotic bacterium, *Mesorhizobium loti* MAFF303099.

[Methods] PNox with a His6 tag was overexpressed in *E. coli* JM109 cells and purified with a Ni-NTA agarose column and a QA52 column. Crystallization was done by the sitting-drop vapour-diffusion method at 277 K. The structure was solved by molecular replacement method. [Results] The crystal structure was refined to R-factor of 18.5% (Rfree 21.9%) at 2.2 Å resolution. The structure has a two domain topology : an FAD binding domain and a substrate binding domain with a typical PHBH fold. Like other GMC family members, PNox contains a conserved histidine residue (His462) in the active site. The second conserved catalytic residue has been suggested to be His460. In most GMC family members, an aromatic residue that is located at the entrance of active site is contiguous with the conserved histidine residue. In PNox however, a histidine residue is contiguous with the conserved histidine.

[Conclusion] In PNox the orientation of the second catalytic histidine is totally different from other GMC family members. The orientation of bound substrate is also likely to be different from other GMC family members.

E - 5 鶏卵白アルブミンをモデルとした Serpinopathy の研究

○田中俊平¹, 石丸隆行¹, 松富直利²
(¹ 山口大農, ² 宇部フロンティア短大)

【目的】 Serpinopathy とは, serine protease inhibitor (Serpin) と呼ばれるタンパク質をコードする遺伝子に変異が入ることで, Serpin が規則的なポリマー構造を形成し, 病変部に凝集蓄積することで, 肝硬変や若年性癩ほう症などを引き起こす遺伝病の総称である。現在までに, 数多くの凝集性変異型 Serpin が報告されている。しかし, 変異による凝集は, その Serpin タンパク質固有のものか, Serpin family 共通に起こるものなのかはよく分かっていない。本実験では Serpin family の一つである鶏卵白アルブミン (OVA) を Serpin タンパク質のモデルとして用い, Serpin の変異導入による影響がそのタンパク質固有なものなのか, Serpin family に共通なものかを検証した。

【方法】 変異導入により, 凝集することが知られている neuroserpin や α -1 antitrypsin の凝集性変異を OVA の相同する部位に導入した。変異型 OVA は酵母発現系を用いて発現させた。変異による影響は, 細胞外への分泌量及び細胞内蓄積量を野生型 OVA と比較することにより, 確かめた。

【結果・考察】 培養 48 時間後の細胞外分泌量を野生型と比較したところ, すべての変異体において低下していた。また蛍光免疫染色法を用いて対数増殖期の細胞内局在を確かめたところ, 変異型 OVA では細胞内に蓄積する傾向が見られた。これらの結果は, 凝集変異型 neuroserpin や α -1 antitrypsin と同様の挙動であった。以上の結果から, Serpinopathy を引き起こす凝集変異は, タンパク質特異的ではなく, Serpin family に共通のものであるということが示唆された。

E - 6 エラープローン PCR による *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素の耐熱化

○松井祐士, 山川 匠, 村松久司, 永田信治
(高知大農)

【目的】 *Pseudomonas putida* の *pp3591* 遺伝子にコードされる DpkA は *N*-メチル-L-アミノ酸脱水素酵素活性を持ち, 医薬品合成中間体として有用な *N*-メチル-L-アミノ酸の不斉合成に有効である。これまでに DpkA を用いた *N*-メチル-L-フェニアラニンの合成が報告されているが, 合成反応を始めてから約半日で DpkA がほぼ失活することが問題になっている。本研究では, ランダム変異導入による DpkA の耐熱性の改良を試みた。【方法】 pET21a(+) の *Nde*I-*Hind*III 部位に *pp3591* 遺伝子を連結し, pDpkA を作製した。pDpkA を鋳型としてエラープローン PCR を行い, 得られた PCR 産物を pUC18 の *Bam*HI-*Eco*RI 部位に連結し, *Escherichia coli* JM109 を形質転換した。得られた 2,447 コロニーの形質転換体の粗酵素液を調製し, 40, 45, 50°C で 30 分間処理した後の残存活性を測定して, 野生型酵素よりも耐熱性が向上した 2 種の変異型酵素 (Q302R, V117M) を選択した。野生型酵素と変異型酵素を精製して性質を調べた。【結果】 野生型酵素を 45°C で 30 分間処理すると残存活性は 3% であったが, Q302R は 35%, V117M は 74% の残存活性を示した。pH 安定性を比較したところ, 野生型酵素は pH6.5 ~ 9.0 で 80% 以上の活性を維持したのに対して, Q302R は pH5.5 ~ 10.5, V117M は pH6.0 ~ 11.0 のより広い範囲で 80% 以上の活性を維持した。さらに, 野生型酵素, Q302R, V117M の反応の温度依存性, pH 依存性, 基質特異性を比較したが明確な違いはなく, 耐熱性の向上した変異型酵素は野生型酵素と同様に様々な *N*-メチル-L-アミノ酸の合成に利用できることが示唆された。

E - 7 植物糖タンパク質フォールディング機構に関与する α -Glucosidase I の機能解析と遺伝子同定

兵庫彬斗¹, 前田 恵², 木村吉伸²
(¹岡山大学, ²岡山大学・院・自然)

【目的】真核生物における分泌型あるいは膜タンパク質の生合成で、*N*-グリカンタンパク質フォールディングに深く関与している。中でもハイマンノース型糖鎖の非還元末端に結合するグルコース残基は、ER中におけるシャペロン分子（カルネキシン、カルレティキュリン）との相互作用において重要な役割を担っている。そこで、植物糖タンパク質の初期フォールディング過程におけるグルコース残基の生理的意義を明らかにする研究の一端として、イネ培養細胞からの α -1, 2-Glucosidase I (Glc'ase I) の精製と機能解析を行った。

【方法・結果】イネ培養細胞を超音波破碎した後、超遠心分離によりミクロゾーム画分を得た。ミクロゾーム画分から 0.1% Triton X 溶液により膜タンパク質を抽出後、陰イオン交換クロマト、ゲルろ過を組み合わせることで Glc'ase I の精製を行った。精製酵素は、分子量約 99kDa (SDS-PAGE) で、至適 pH は 6.5、至適温度は 37°C であった。蛍光標識糖鎖 (Glc₃Man₄8GlcNAc₂-PA) を用いて α 1-2Glc 残基の加水分解に及ぼす Man 残基の影響を調べたが、 α -Man 残基の分枝構造は Glc'ase I 活性に対して影響を及ぼさないことが明らかになった。Diethyl pyrocarbonate 処理によって活性が低下したことから、His 残基が酵素活性に重要な役割を担うことが示唆された。Swainsonine, Nigerose による活性阻害は確認されず、Deoxynojirimycin, Castanospermine, Kojibiose によって活性が阻害された。現在、イネ Glc'ase I の候補遺伝子の酵母による発現系構築を行っている。

E - 8 植物抗原性糖鎖含有糖ペプチドの多量精製とヒト免疫修飾活性の解析

○眞野 彩¹, 前田 恵², 大槻剛巳³, 木村吉伸²
(¹岡山大学, ²岡山大学・院・自然, ³川崎医大・衛生)

【目的】植物抗原性糖鎖 (PAG) がスギ花粉症患者 Th2 細胞のスギ花粉アレルゲン Cry j1 による細胞増殖と IL-4 産生を抑制する¹⁾メカニズムを解明するため、PAG 含有の糖ペプチドの多量精製法を確立し、ヒト免疫担当細胞における免疫修飾活性を解析した。【方法・結果】銀杏種子貯蔵タンパク質を還元カルボキシメチル化後、1% ギ酸中でペプシン消化した。ペプシン消化物から陽イオン交換およびサイズ排阻クロマトグラフィー (SF)-HPLC により PAG 含有糖ペプチドを精製した。ヒドラジン分解後、遊離糖鎖を *N*-アセチル化、ピリジルアミノ化して蛍光標識糖鎖を調製し、結合する糖鎖構造を LC-MS, MS/MS 等によって解析した。その結果、精製糖ペプチドに結合する主要糖鎖は Man₃Xyl1Fuc1GlcNAc₂ (73%) であることが確認された。ヒト免疫修飾活性測定にはリンパ球混合培養法 (MLR) を用いた。ナイーブ CD4⁺ T 細胞はアロジェニックな CD14⁺ 単球から IL-4 と GM-CSF で誘導した未分化樹状細胞と 5 日間混合培養し増殖させた。次いで IL-2 添加培地で 6 日間増殖させ、抗 CD3 抗体で一晩刺激した。培養上清に産生されたサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-10) は Cytometric Bead Array で測定した。その結果、予想と反して、植物抗原性糖鎖含有糖ペプチドは、濃度依存的に Th1 型サイトカイン (IFN- γ) 産生を抑制し、Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-10) 産生を高める結果であった。現在、ペプチドをさらに短くした糖ペプチドの精製、免疫活性の測定を試みている。

1) Okano M., Kimura Y., Maeda M., *et al.*, *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 770-778 (2004)

E - 9 新生糖タンパク質フォールディングに関与する植物 α -Glucosidase II の精製と発現系構築

○村田翔平¹, 前田 恵², 木村吉伸²
(¹岡山大農, ²岡山大院・自然)

【目的】小胞体中で構築される糖タンパク質糖鎖 (*N*-グリカン) には, 非還元末端にグルコース (Glc) 残基が 3 分子結合している。Glc 残基を非還元末端に持つ *N*-グリカンは, 小胞体中での新生タンパク質の品質管理機構で重要な役割を担っており, そのトリグルコシルユニット中に存在する α 1-3Glc 残基の加水分解を司る α -Glucosidase II (α -Glc'ase II) 活性は, 小胞体シャペロンを介したタンパク質フォールディングに重要な影響を与える。植物細胞中における糖タンパク質フォールディング α -Glc'ase II の機能特性を明らかにする研究の一端として, 本研究ではイネ培養細胞からの α -Glc'ase II の精製, キャラクターゼーション, 遺伝子同定を行った。

【方法・結果】イネ培養細胞から超遠心分離法によりマイクロゾーム画分を調製した。マイクロゾーム画分から 0.2% Triton X-100 溶液により膜タンパク質を抽出後, 陰イオン交換クロマト, ゲルろ過, アフィニティクロマト等を組み合わせることで, α -Glc'ase II を精製した。酵素活性は, *p*NP- α -Glc 及び, 蛍光標識糖鎖 (Glc₁₋₂Man₉GlcNAc₁-PA) を基質に用いて測定した。精製酵素は分子量約 220kDa (ゲルろ過) であり, 至適 pH は弱酸性~中性領域にあった。また, Glc1Man9 \rightarrow Man9 変換よりも Glc2Man9 \rightarrow Glc1Man9 変換への反応速度が速い傾向が見られた。一方, イネ α -Glc'ase II 遺伝子については, *A.thaliana* 酵素の遺伝子情報を基に候補遺伝子を検索し, 酵母での発現系構築を行っている。

E - 10 深海微生物由来 Cytochrome *c*₅ の安定性

○政成美沙¹, 若井 暁¹, 加藤千明², 為我井秀行³, 栗原達夫⁴, 三本木至宏¹
(¹広大院・生物圏, ²JAMSTEC, ³日大・文理, ⁴京大・化研)

【目的・背景】蛋白質が熱によって変性することはよく知られているが, 圧力によっても蛋白質は変性する。しかし, 熱安定性と圧力耐性の関係はまだ知られていない。深海は高圧力環境である。そのため, 深海微生物の生産する蛋白質は圧力耐性を持つはずである。本研究の目的は, 深海微生物の Cytochrome *c*₅ (Cyt *c*₅) の熱安定性を測定し, 圧力耐性との関係を探ることである。

【方法・結果】本研究では, 深海に生息する好冷好圧菌 *Shewanella violacea* および *Shewanella benthica* 由来 Cyt *c*₅ (以下 SV および SB) と, 浅海に生息する好冷常圧菌 *Shewanella livingstonensis* 由来 Cyt *c*₅ (以下 SL) を, 大腸菌を用いて異種発現した。これらは 73.7% のアミノ酸配列が一致している。得られた Cyt *c*₅ の熱安定性を測定したところ, SB や SV は SL よりも高い熱安定性を示した。

【考察】本研究に用いた *Shewanella* 属細菌は, どれも好冷菌である。本来, 好冷菌由来の蛋白質は熱安定性が低い傾向がある。しかし, 同じ好冷菌由来であるにも関わらず, SV や SB は SL よりも高い熱安定性を示した。これは, SV や SB が深海由来であり, 圧力耐性を持っているためと考えることが出来る。3 種の Cyt *c*₅ のアミノ酸配列を比較すると, ヘムに近い位置に側鎖を持つ 50 番目のアミノ酸が, SL は Leu であるのに対し, SV や SB では Lys である。この Lys がヘムと水素結合を形成しているため, 高い安定性を示している可能性があると考えている。今後は, この 50 番目のアミノ酸について変異を導入し, 熱安定性や圧力耐性を測定する予定である。

E - 11 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* のマンガン依存性プロテインホスファターゼ Pph3 における保存アミノ酸残基の機能解析

○森 裕美, 木村義雄
(香川大農)

【目的】 粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の Pph3 は Mn^{2+}/Mg^{2+} 依存性プロテインホスファターゼ (PPM) ファミリーに属するプロテインホスファターゼで、この酵素での活性に重要な役割を有していると考えられるアミノ酸の特異的変異酵素を作製し、基質及び金属塩の K_m や K_{cat} を求め、活性に与える影響からそのアミノ酸の役割を考察した。

【方法・結果】 脱リン酸化反応に重要だと思われる部位の 1 アミノ酸置換及び欠失をさせた酵素を作製し、活性を測定した。すでに立体構造が解析されている酵素との比較などから金属結合に関与していると推測されるアミノ酸の変異酵素では、大幅な活性の減少と Mn^{2+} に対する K_m 値の上昇が、リン酸基と結合をしていると推測されるアミノ酸変異酵素では、 K_{cat} は 10 分の 1 以下になった。また Pph3 はその C 末端に cNMP 結合領域を有する酵素で、脱リン酸化反応にメルカプトエタノールを必要とする。しかし cNMP 結合領域欠損酵素ではメルカプトエタノール非存在下でも高い活性を示した。また野生型酵素では cAMP の添加により活性の上昇がみられたが、cNMP 結合領域で保存されている 3 アミノ酸を変異させた酵素では cAMP 添加条件下で野生型のそれより若干の活性低下がみられた。これらの結果から、Pph3 は S-S 結合を切断されることで活性が上昇するが、cNMP 結合領域はその切断を起りにくくしていること、また C 末端に cAMP が結合する事でメルカプトエタノールによる S-S 結合の切断が起りやすくなっていることが考えられた。

日本農芸化学会中四国支部 維持会員 (2011/9/1 現在 65 社)

天野エンザイム(株)岐阜研究所
アルファー食品(株)
(株)井ゲタ竹内
池田糖化工業(株)
(株)猪原商会 山口営業所
(株)大熊
大塚アグリテクノ(株)
大塚器械(株)西条支店
岡山県酒造組合
社団法人岡山県農業開発研究所
オハヨー乳業(株)
(株)海産物のきむらや
片山化学工業(株)岡山営業所
カバヤ食品(株)
機能性食品開発研究所
杏林予防医学研究所
協和発酵バイオ(株)
山口事業所生産技術研究所
キリンビール(株)岡山工場
久保田商事(株)広島営業所
高知酒造(株)
寿製菓(株)
(株)四国総合研究所
四国乳業(株)
(株)シマヤ
新青山(株)
神協産業(株)
(株)酔心山根本店
諏訪酒造(株)
正晃(株)山口営業所
仙味エキス(株)
(株)ソフィ
(株)大愛
大興産業(株)
大山乳業農業協同組合
大山ハム(株)
大洋香料(株)
高塚ライフサイエンス(株)
(有)タグチ
中国ケミー(株)
帝國製菓(株)
鳥取科学器械(株)
(有)友田大洋堂
日本オリーブ(株)
(株)日本総合科学
白牡丹酒造(株)
(株)林原生物化学研究所
備前化成(株)
ひまわり乳業(株)
(株)水温研究所
広島和光(株)岡山営業所
(株)扶桑理化
プロテノバ(株)
マルキン忠勇(株)技術研究所
丸善製菓(株)
マルトモ(株)
三島食品(株)
(株)宮田薬品
(株)無手無冠
ヤスハラケミカル(株)
ヤマキ(株) (H23 年度入会)
(株)やまだ屋
山本薬品(株)
両備ホールディングス(株)事業開発部
ルナ物産(株)
湧永製菓(株)中央研究所
(五十音順)

日本農芸化学会中四国支部第 36 回講演会

代表世話人：中島 廣光

連絡先：鳥取大学農学部生物資源環境学科

TEL：0857-31-5362

E-mail: nakajima@muses.tottori-u.ac.jp

支部からのお知らせ

- 第17回市民フォーラム（支部創立10周年記念）
開催日：2012年3月17日（土）
場 所：広島大学総合科学部
内 容：「農学・農芸化学で夢よ、拓け！」
世話人：矢中規之

- 第18回市民フォーラム（支部創立10周年記念）
開催日：2012年5月26日（土）
場 所：愛媛大学農学部
世話人：渡部保夫

- 第33回講演会（支部創立10周年記念例会）
開催日：2012年6月2日（土）
場 所：愛媛大学農学部
内 容：特別講演（海老原清氏）
世話人：岸田太郎

- 第19回市民フォーラム（支部創立10周年記念）
開催日：2012年6月23日（土）
場 所：サンポートホール高松第54会議室
内 容：(仮)「甘くて酸っぱい健康に良い話」
世話人：合谷祥一

- 第34回講演会（支部創立10周年記念支部大会）
開催日：2012年9月21日（金），22日（土）
場 所：山口大学工学部キャンパス（宇部市）
世話人：赤田倫治

- 第20回市民フォーラム（支部創立10周年記念）
開催日：2012年9月22日（土）
場 所：山口大学工学部キャンパス（宇部市）
内 容：(仮)「遺伝子組換えのホントのこと」
世話人：星田尚司

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒753-8515 山口市吉田1677-1
山口大学農学部内
ホームページ <http://jsbba-cs.jp>

2012年（平成24年）1月21日発行